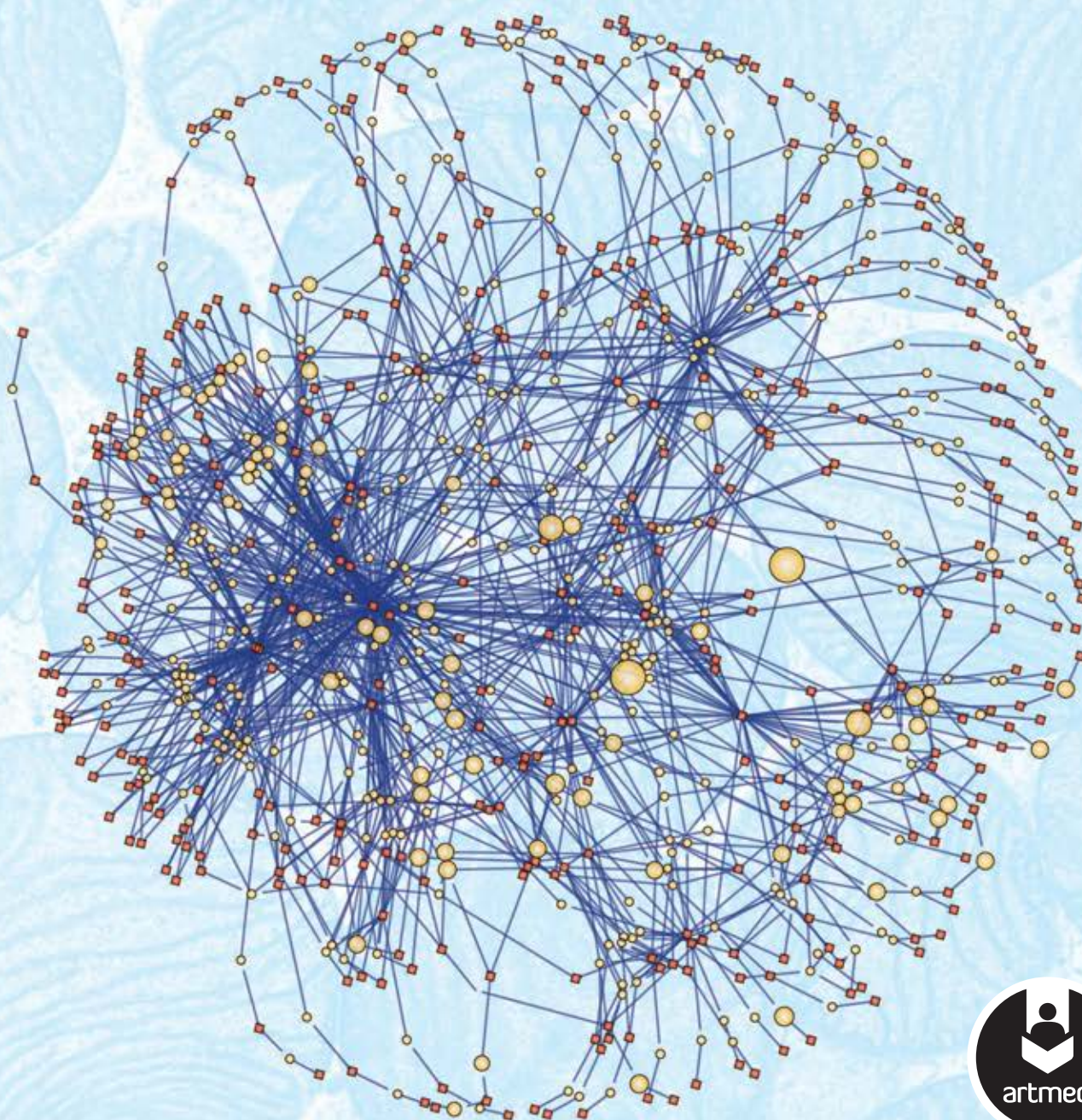
6ª Edição

# Princípios de Bioquímica de Lehninger

David L. Nelson | Michael M. Cox

artmed

## Equipe de tradução

**Ana Beatriz Gorini da Veiga** (Capítulo 27)
Professora adjunta da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).
Doutora em Biologia Celular e Molecular pela
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

**Angelica Rosat Consiglio** (Capítulo 11)
Professora associada do Departamento de Biofísica do Instituto de
Biociências e Professora do Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da UFRGS.
Mestre e Doutora em Ciências Biológicas: Fisiologia pela UFRGS.
Pós-doutora pela Tufts University, EUA.

**Carla Dalmaz** (Capítulos 18 e 22)
Professora associada do Departamento de Bioquímica da UFRGS.
Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Paraná (UFPR).

**Carlos Termignoni** (Capítulo 6)
Professor associado do Centro de Biotecnologia e
Departamento de Bioquímica da UFRGS.
Mestre e Doutor em Biologia Molecular pela Escola Paulista de
Medicina, Universidade Federal de São Paulo (EPM-UNIFESP).

**Diego Bonatto** (Capítulos 25 e 26)
Mestre e Doutor em Biologia Celular e Molecular pela UFRGS.

**Hugo Verli** (Capítulo 3)
Professor adjunto do Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia da UFRGS.
Doutor em Biologia Celular e Molecular pela UFRGS.

**Lúcia Rebello Dillenburg** (Capítulos 19 e 20)
Professora associada do Departamento de Botânica da UFRGS.
Doutora em Botânica pela University of Maryland (College Park, EUA).

**Luís Fernando Marques Dorvillé** (Capítulos 3, 9, 25, 26 e 28, Índice)
Professor adjunto de Ciências Biológicas do Departamento de Ciências da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Doutor em Educação pela Universidade Federal Fluminense (UFF).

**Maria Luiza Saraiva Pereira** (Capítulos 8 e 24)
Professora associada do Departamento de Bioquímica da UFRGS.
Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica pela UFRGS.
Doutora em Biologia Molecular pela United Medical and Dental Schools of
Guy's and St Thomas's Hospitals, University of London, United Kingdom (UK).

**Michele Bastiani** (Capítulos 7, 12 e 16)
Farmacêutica. Mestre em Biologia Celular e Molecular pela UFRGS.
Doutora em Biologia Celular pelo Institute for Molecular Bioscience, University of Queensland, Austrália.

**Renato Moreira Rosa** (Capítulos 9 e 28)
Mestre e Doutor em Bioquímica pela UFRGS.

**Sandra Estrazulas Farias** (Iniciais, Capítulos 5, 15 e 23, Abreviaturas, Glossário e Créditos)
Professora associada do Departamento de Fisiologia e Centro de Biotecnologia da UFRGS.
Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular pela EPM-UNIFESP.

**Simone Köbe de Oliveira** (Capítulos 4, 10, 13, 14, 17 e 21)
Doutora em Ciências pela UFRGS. Pós-Doutoranda em Biotecnologia e
Biociências na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

**Tarso Ledur Kist** (Capítulos 1 e 2)
Professor associado da UFRGS.
Doutor pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio) e
Pós-Doutor pela Faculty of Science, University of Ottawa,
Canadá e pelo Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlim, Alemanha.

David L. Nelson
*Professor of Biochemistry*
*University of Wisconsin-Madison*

Michael M. Cox
*Professor of Biochemistry*
*University of Wisconsin-Madison*

6ª Edição

# Princípios de Bioquímica de Lehninger

**Revisão técnica desta edição**

**Carlos Termignoni**
(Capítulos 10, 13, 14, 15, 16 e 17)
Professor associado do Centro de Biotecnologia e do Departamento de Bioquímica da UFRGS.
Mestre e Doutor em Biologia Molecular pela Escola Paulista de Medicina,
Universidade Federal de São Paulo (EPM-UNIFESP).

**Gaby Renard**
(Capítulos 5, 8, 9, 25, 26 e 27)
Pesquisadora da Quatro G Pesquisa e Desenvolvimento Ltda., TECNOPUC.
Mestre e Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica pela UFRGS.

**Maria Luiza Saraiva Pereira**
(Capítulos 18, 20, 21, 22 e 28, Iniciais, Abreviaturas, Glossário, Créditos e Índice)
Professora associada do Departamento de Bioquímica da UFRGS.
Doutora em Biologia Molecular pela United Medical and Dental Schools of Guy's and
St Thomas's Hospitals, University of London, United Kingdom (UK).

**Sandra Estrazulas Farias**
(Capítulos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 11, 12, 19, 23 e 24)
Professora associada do Departamento de Fisiologia e do Centro de Biotecnologia da UFRGS.
Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular pela EPM-UNIFESP.

Versão impressa
desta obra: 2014

2014

Obra originalmente publicada por W.H.Freeman and Company, New York, sob o título
*Lehninger principles of biochemistry,* 6th edition
ISBN 9781429234146



Gerente editorial: *Letícia Bispo de Lima*

**Colaboraram nesta edição:**

Editora: *Simone de Fraga*

Assistente editorial: *Mirela Favaretto*

Arte sobre capa original: *Márcio Monticelli*

Preparação de originais: *Henrique de Oliveira Guerra*

Leitura final: *Carine Garcia Prates e Heloísa Stefan*

Editoração: *Techbooks*

N425p Nelson, David L.
Princípios de bioquímica de Lehninger [recurso eletrônico] / David L. Nelson, Michael M. Cox ; [tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga ... et al.] ; revisão técnica: Carlos Termignoni ... [et al.]. – 6. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre : Artmed, 2014.

Editado também como livro impresso em 2014.
ISBN 978-85-8271-073-9

1. Bioquímica. I. Cox, Michael M. II. Título.

CDU 577

Catalogação na publicação: Ana Paula M. Magnus – CRB 10/2052

Reservados todos os direitos de publicação, em língua portuguesa, à
ARTMED EDITORA LTDA., uma empresa do GRUPO A EDUCAÇÃO S.A.
Av. Jerônimo de Ornelas, 670 – Santana
90040-340 – Porto Alegre – RS
Fone: (51) 3027-7000 Fax: (51) 3027-7070



Unidade São Paulo
Av. Embaixador Macedo Soares, 10.735 – Pavilhão 5 – Cond. Espace Center
Vila Anastácio – 05095-035 – São Paulo – SP
Fone: (11) 3665-1100 Fax: (11) 3667-1333

SAC 0800 703-3444 – www.grupoa.com.br

IMPRESSO NO BRASIL
*PRINTED IN BRAZIL*

## Para nossos Professores

Albert Finholt
Arthur Kornberg
David E. Sheppard
Earl K. Nelson
Eugene P. Kennedy
Harold B. White
Homer Knoss
I. Robert Lehman
Paul R. Burton
Wesley A. Pearson
William P. Jencks

## Nota

Assim como a medicina, a bioquímica é uma ciência em constante evolução. À medida que novas pesquisas e a própria experiência clínica ampliam o nosso conhecimento, são necessárias modificações na terapêutica, onde também se insere o uso de medicamentos. Os autores desta obra consultaram as fontes consideradas confiáveis, num esforço para oferecer informações completas e, geralmente, de acordo com os padrões aceitos à época da publicação. Entretanto, tendo em vista a possibilidade de falha humana ou de alterações nas ciências médicas, os leitores devem confirmar estas informações com outras fontes. Por exemplo, e em particular, os leitores são aconselhados a conferir a bula completa de qualquer medicamento que pretendam administrar, para se certificar de que a informação contida neste livro está correta e de que não houve alteração na dose recomendada nem nas precauções e contraindicações para o seu uso. Essa recomendação é particularmente importante em relação a medicamentos introduzidos recentemente no mercado farmacêutico ou raramente utilizados.

# Sobre os Autores

**David L. Nelson,** nascido em Fairmont, Minnesota, formou-se em Química e Biologia no St. Olaf College em 1964 e obteve o doutorado em Bioquímica pela Stanford Medical School sob a orientação de Arthur Kornberg. Foi pós-doutorando na Harvard Medical School sob supervisão de Eugene P. Kennedy, um dos primeiros estudantes graduados de Albert Lehninger. Em 1971, Nelson ingressou na University of Wisconsin-Madison e tornou-se professor catedrático de bioquímica em 1982. Foi diretor do Center for Biology Education na University of Wisconsin-Madison por oito anos.

O trabalho de pesquisa de Nelson está focado nas transduções de sinal que regulam o movimento ciliar e a exocitose no protozoário *Paramecium.* As enzimas envolvidas, incluindo uma grande variedade de proteínas-cinases, são os principais objetos de estudo. Seu grupo de pesquisa tem utilizado purificação enzimática, técnicas imunológicas, microscopia eletrônica, genética, biologia molecular e eletrofisiologia para estudar esses processos.

David Nelson tem uma história notável como professor universitário e supervisor de pesquisa. Por 40 anos, lecionou cursos intensivos de bioquímica para estudantes de graduação em bioquímica avançada. Também lecionou bioquímica para estudantes de enfermagem e cursos de graduação sobre estrutura e função de membrana e neurobiologia molecular. Foi orientador de inúmeros trabalhos de doutorado, mestrado e de graduação, tendo recebido prêmios por sua docência, incluindo o Prêmio Dreyfus Teacher-Scholar, o Atwood Distinguished Professorship e o Prêmio Unterkofler Excellence in Teaching da University of Wisconsin. Entre os anos de 1991 a 1992, foi professor visitante de química e biologia no Spelman College. Seu segundo amor é a história, motivo pelo qual começou a ensinar história da bioquímica para estudantes de graduação e a colecionar instrumentos científicos antigos para serem usados em um curso de técnicas de laboratório que ele ministra.

David L. Nelson e Michael Cox

**Michael M. Cox** nasceu em Wilmington, Delaware. No seu primeiro curso de bioquímica, o livro *Princípios de Bioquímica de Lehninger* teve uma grande influência no redirecionamento do seu fascínio pela biologia e o inspirou a seguir a carreira de bioquímico. Depois de graduar-se pela University of Delaware em 1974, Cox ingressou na Brandeis University, onde realizou seu trabalho de doutorado com William P. Jencks. Depois partiu para Stanford em 1979 para fazer o pós-doutorado com I. Robert Lehman. Mudou-se para a University of Wisconsin-Madison em 1983 e tornou-se professor catedrático de bioquímica em 1992.

O trabalho de doutorado de Cox foi sobre catálise geral acidobásica como um modelo para as reações catalisadas por enzimas. Em Stanford, começou a trabalhar com as enzimas envolvidas na recombinação genética. O trabalho enfocava principalmente a proteína *RecA*, com o desenvolvimento de métodos de purificação e ensaios que ainda estão em uso, e o esclarecimento do processo de migração do DNA na descendência. O estudo das enzimas da recombinação genética permanece como tema central de sua pesquisa.

Michael Cox coordena um grande e ativo grupo de pesquisa em Wisconsin, investigando a enzimologia, a topologia e a energética da recombinação genética. Seu foco principal está no mecanismo de troca de fita de DNA mediada pela proteína *RecA*, o papel do ATP no sistema *RecA* e a regulação do reparo por recombinação do DNA. Parte do programa de pesquisa está focado nos organismos que exibem uma grande capacidade de reparo do DNA, tal como *Deinococcus radiodurans,* e a aplicação desses sistemas de reparo na biotecnologia.

Durante quase 30 anos, Cox tem lecionado (juntamente com David L. Nelson) em cursos intensivos de bioquímica, para estudantes de graduação, e sobre estrutura e topologia de DNA, interações DNA-proteína, bem como a bioquímica da recombinação em cursos de pós-graduação. Os projetos mais recentes consistem na organização de um novo curso sobre responsabilidade profissional para estudantes do primeiro ano da pós-graduação e o estabelecimento de um programa sistemático para atrair para o laboratório estudantes de bioquímica talentosos em um estágio inicial de suas carreiras universitárias. Recebeu prêmios por suas atividades tanto de ensino como de pesquisa, incluindo o Prêmio Dreyfus Teacher-Scholar, em 1989, o Prêmio da Eli Lilly em química biológica e, em 2009, o Prêmio Regents Teaching Excellence da University of Wisconsin. Ele é também muito ativo nos esforços nacionais de prover novas diretrizes para a educação em bioquímica no nível de graduação. Seus *hobbies* incluem a transformação de 18 acres de uma fazenda no Wisconsin em um arboreto, coleção de vinhos e participação em projetos de prédios de laboratórios.

# Nota sobre a Natureza da Ciência

No século XXI, a educação científica com frequência deixa de lado o suporte filosófico da ciência ou confia em definições simplificadas demais. Se você pretende seguir uma carreira em ciências, pode ser útil considerar uma vez mais os termos **ciência**, **cientista** e **método científico**.

**Ciência** é tanto um modo de pensar sobre o mundo natural como a soma das teorias e informações que resultam desse pensamento. O poder e o sucesso da ciência resultam diretamente da confiança nas ideias a serem testadas: informação sobre fenômenos naturais que podem ser observados, medidos e reproduzidos, além de teorias que têm valor prognóstico. O progresso da ciência se baseia em uma suposição fundamental muitas vezes não explícita, mas crucial para a empreitada: a de que as leis que governam as forças e os fenômenos existentes no universo não estão sujeitas a mudanças. O ganhador do Prêmio Nobel Jacques Monod se referiu a essa suposição como o "postulado da objetividade". Assim, o mundo natural pode ser compreendido aplicando-se um processo de questionamento – o método científico. A ciência não poderia ter sucesso em um universo que nos pregasse peças. Diferentemente do postulado da objetividade, a ciência não faz nenhuma afirmativa inviolável sobre o mundo natural. Uma ideia científica útil é aquela que (1) tenha sido ou possa ser mensurada de maneira reprodutível e (2) pode ser utilizada para prever novos fenômenos de maneira precisa.

As ideias científicas podem assumir muitas formas. Os termos que os cientistas utilizam para descrevê-las têm significados bem diferentes daqueles aplicados por não cientistas. Uma *hipótese* é uma ideia ou afirmação que fornece uma explicação razoável ou testável para uma ou mais observações, mas talvez não tenha ampla comprovação experimental. Uma *teoria científica* é muito mais do que um palpite. É uma ideia comprovada até certo ponto e que fornece informações para um corpo de observações experimentais. Uma teoria pode ser testada e desenvolvida, constituindo, assim, uma base para avanços e inovações. Quando uma teoria científica é repetidamente testada e validada em várias frentes, pode ser aceita como fato.

É importante ressaltar que aquilo que constitui a ciência ou uma ideia científica se define pelo fato de ser ou não publicado na literatura científica após ter sido revisado por outros cientistas. Cerca de 16 mil revistas científicas revisadas por cientistas publicam, no mundo todo, por volta de 1,4 milhão de artigos a cada ano, uma rica e contínua safra de informações que é patrimônio de todo ser humano.

**Cientistas** são indivíduos que aplicam rigorosamente o método científico para compreender o mundo natural. O fato de ser graduado em determinada disciplina não torna a pessoa um cientista, nem a falta de tal graduação impede que alguém faça importantes contribuições científicas. Um cientista precisa ter o ímpeto de desafiar uma ideia quando novos achados o exigem. As ideias que um cientista aceita devem ser fundamentadas em observações reproduzíveis e mensuráveis, relatando essas observações com total honestidade.

O **método científico** é, na realidade, uma coleção de caminhos, todos levando a uma descoberta científica. No caminho da *hipótese e experimentação*, o cientista levanta uma hipótese e a submete a um teste experimental. Muitos processos com os quais os bioquímicos trabalham todos os dias foram descobertos dessa maneira. A estrutura do DNA elucidada por James Watson e Francis Crick levou à hipótese de que os pares de bases constituíam a base para a transferência de informações na síntese de polinucleotídeos. Essa hipótese ajudou a inspirar a descoberta da DNA-polimerase e da RNA-polimerase.

Watson e Crick produziram sua estrutura do DNA por meio de um processo de *construção de modelo e cálculo.* Não houve experimento real envolvido, embora a construção do modelo e os cálculos realizados tenham utilizado dados coletados por outros cientistas. Muitos cientistas aventureiros aplicaram o processo de *exploração e observação* como um caminho para a descoberta. Viagens históricas de descoberta (entre elas a de Charles Darwin no *H.M.S. Beagle*, em 1831) ajudaram no mapeamento do planeta, na catalogação dos seres vivos, e modificaram a forma como encaramos o mundo. Os cientistas modernos seguem um caminho semelhante quando exploram as profundezas do oceano ou lançam sondas para outros planetas. Um processo análogo ao da hipótese e experimentação é o da *hipótese e dedução.* Crick fundamentou que deveria existir uma molécula adaptadora que facilitasse a tradução da informação do RNA mensageiro em proteína. Essa hipótese do adaptador levou à descoberta do RNA de transferência, por Mahlon Hoagland e Paul Zamecnik.

Nem todos os caminhos para a descoberta envolvem planejamento. Frequentemente a *sorte* também faz sua parte. A descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928, e dos RNA catalisadores por Thomas Cech, no início dos anos 1980, foram duas descobertas feitas por um golpe de sorte, embora alcançadas por cientistas bem preparados para explorá-las. A *inspiração* também pode levar a importantes avanços. A reação em cadeia da polimerase (PCR), que atualmente constitui parte central da biotecnologia, foi desenvolvida por Kary Mullis após um lampejo de inspiração durante uma viagem pelo norte da Califórnia em 1983.

Esses diversos caminhos que levam à descoberta científica podem parecer um tanto diferentes, mas têm importantes aspectos em comum. Eles se concentram no mundo natural. Baseiam-se na *observação* e/ou *experimentação reproduzíveis*. Todas as ideias, palpites e fatos experimentais que se originam dessas empreitadas podem ser testados e reproduzidos por cientistas em qualquer lugar do mundo. Todos podem ser utilizados por outros cientistas para construir novas hipóteses e fazer novas descobertas. Todos levam à informação, que é incluída apropriadamente no mundo da ciência. A compreensão do universo requer trabalho árduo. Ao mesmo tempo, nenhuma jornada humana é mais empolgante e potencialmente recompensadora do que a tentativa, às vezes bem-sucedida, de compreender parte do mundo natural.

# Prefácio

À medida que completamos a 6ª edição da obra *Princípios de Bioquímica de Lehninger,* somos novamente surpreendidos pelas mudanças extraordinárias no campo da bioquímica que ocorreram entre as edições. O enorme volume de novas informações de sequenciamento de DNA de alto rendimento, cristalografia por raios X e a expressão gênica e manipulação de genes, para citar somente três exemplos, desafia tanto o pesquisador experiente como o estudante de bioquímica principiante. Nosso objetivo é atingir um equilíbrio: incluir novos e interessantes resultados de pesquisas sem tornar o livro muito pesado para os estudantes. O principal critério para a inclusão é que o novo resultado ajude a ilustrar um importante *princípio da bioquímica*.

A imagem da capa, um mapa das transformações metabólicas conhecidas em uma mitocôndria, ilustra a riqueza do material disponível atualmente sobre as transformações bioquímicas. Não é mais possível tratar as “vias” metabólicas como se ocorressem de modo isolado; um único metabólito pode fazer parte simultaneamente de muitas vias em uma rede tridimensional de transformações metabólicas. A pesquisa bioquímica se concentra mais e mais nas interações entre essas vias, na regulação de suas interações no nível do gene e da proteína e nos efeitos da regulação sobre as atividades da célula ou do organismo inteiro.

Esta edição de *Princípios de Bioquímica de Lehninger* reflete essa realidade. Muito do conteúdo adicionado reflete a compreensão crescente e sofisticada sobre os mecanismos de regulação, incluindo aqueles envolvidos na alteração da síntese e da degradação de enzimas, os responsáveis pelo controle e sincronização da síntese de DNA e do ciclo celular e aqueles que integram o metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas ao longo do tempo em resposta a alterações no meio ambiente e nos diferentes tipos celulares.

Apesar do esforço para incorporar os últimos e principais avanços, determinados aspectos do livro permanecem inalterados. Continua-se enfatizando a relevância da bioquímica nos mecanismos moleculares das doenças, destacando o seu papel fundamental no avanço da saúde e do bem-estar humano. A base metabólica do diabetes e os fatores que predispõem à doença é um tema especial. Este tema está entremeado em muitos capítulos e serve para integrar a discussão do metabolismo. A teoria da evolução é a base sobre a qual repousam todas as ciências biológicas, e a todo instante é ressaltado seu importante papel para a bioquímica.

O progresso em bioquímica, em um grau significativo, avança em paralelo com o desenvolvimento de técnicas e ferramentas melhores. Portanto, destacamos alguns desses desenvolvimentos cruciais. O Capítulo 9, Tecnologias da informação com base em DNA, em particular, foi revisado de modo significativo para incluir os últimos avanços em genômica e no sequenciamento da próxima geração.

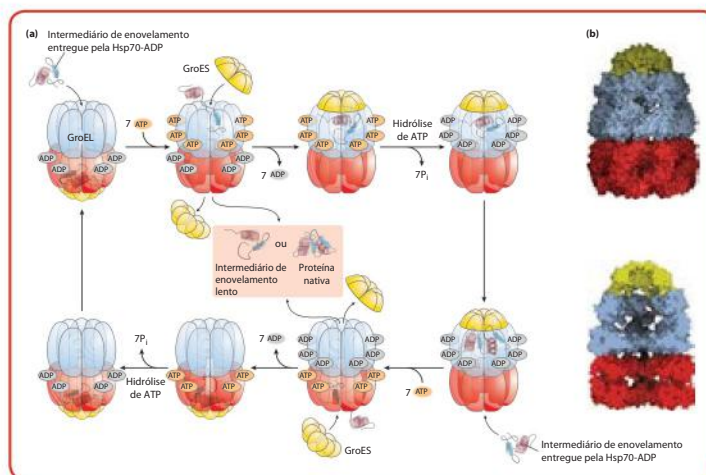
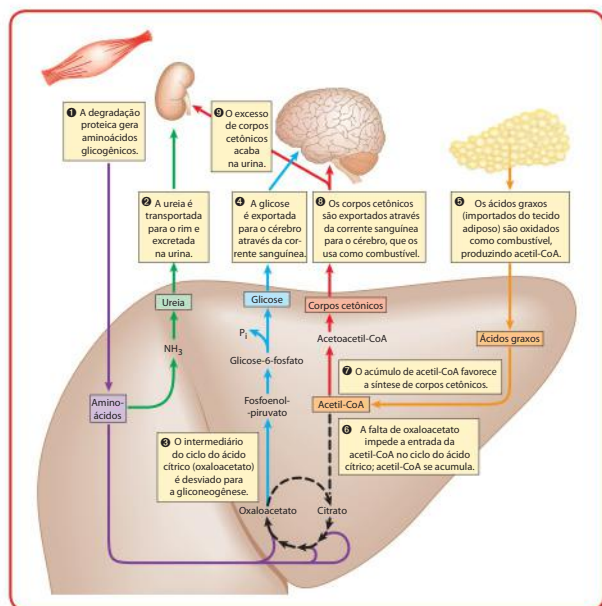
Por fim, foi dedicada muita atenção para tornar o texto e as figuras ainda mais úteis aos estudantes que estão cursando bioquímica pela primeira vez. Para aqueles que já conhecem o livro, algumas dessas mudanças se tornam óbvias logo que o abrirem.

Em cada revisão deste livro-texto, existe sempre o empenho para manter a qualidade que tornou o texto original de Lehninger um clássico com redação clara, explicações cuidadosas de conceitos complexos e a comunicação esclarecedora aos estudantes sobre os meios pelos quais a bioquímica é entendida e praticada hoje. Os autores escrevem juntos há quase 25 anos e pensam juntos sobre bioquímica há quase 30. Os milhares de estudantes na University of Wisconsin-Madison têm sido, ao longo desses anos, uma contínua fonte de ideias de como apresentar a bioquímica de forma mais clara, servindo como fonte de inspiração e esclarecimento. Espera-se que esta 6ª edição do *Lehninger* esclareça e inspire a todos os atuais estudantes de bioquímica e, quem sabe, leve alguns deles a amar a bioquímica como nós a amamos.

## Novas figuras

A mudança mais óbvia no livro é a reformulação completa das figuras. O objetivo foi aumentar a pedagogia, utilizando recursos gráficos modernos para tornar o assunto o mais claro possível. Muitas figuras ilustram novos tópicos e o estilo gráfico foi refeito e modernizado. As características que definem as novas figuras incluem:

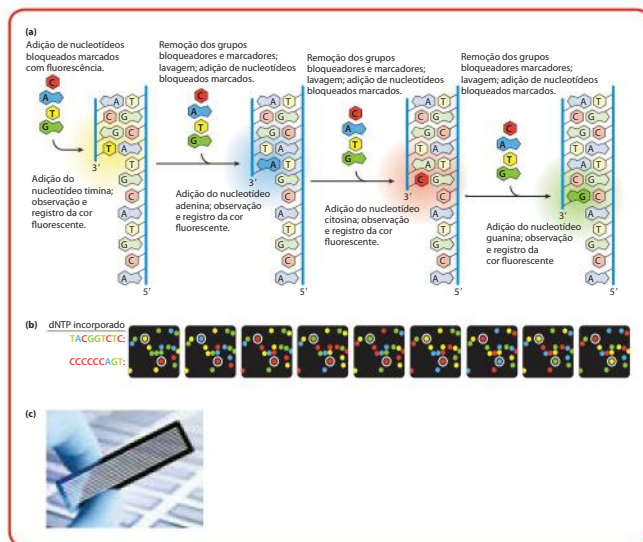
- **Interpretação mais inteligente de figuras clássicas**, são mais fáceis de ler e compreender;

Chaperoninas no enovelamento de proteínas

- **Figuras que formam par com desenhos esquemáticos**, geradas especificamente para este livro, com esquemas de formas e cores internamente consistentes
- Figuras com **etapas numeradas e comentadas** ajudam a explicar processos complexos e, em muitos casos, textos descritivos da legenda foram transferidos para a própria figura
- **Resumos ilustrados** ajudam o estudante a lembrar o quadro geral enquanto estuda as partes específicas

Metabolismo energético no fígado durante jejum prolongado ou no diabetes melito não controlado

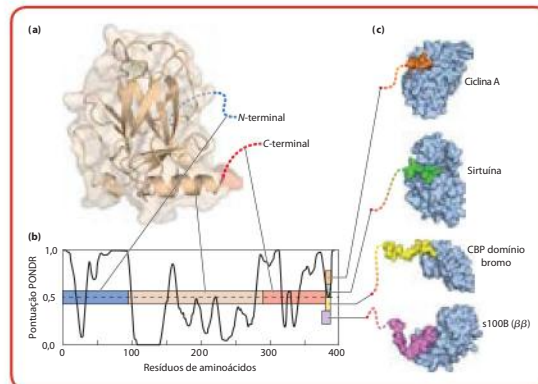
## Genômica atualizada

As técnicas modernas da genômica transformaram nosso entendimento da bioquímica. Nesta edição, atualizamos significativamente a cobertura dos métodos genômicos e suas aplicações. O Capítulo 9, Tecnologias da informação com base no DNA, foi completamente revisado para incorporar os últimos métodos genômicos. Muitos outros capítulos foram atualizados para refletir os avanços obtidos com esses métodos. Entre os novos métodos genômicos discutidos nesta edição estão:

- Sequenciamento de DNA de próxima geração, incluindo os métodos e plataformas de sequenciamento *Illumina* e 454 (Capítulo 9)
- Aplicações da genômica, incluindo o uso de haplótipos para rastrear migrações humanas e filogenética para localizar genes humanos associados com doenças hereditárias (Capítulo 9)
- Genotipagem forense e o uso de genômica personalizada na medicina (Capítulo 9)

Sequenciamento de próxima geração de terminação reversível

## Ciência nova

Todos os capítulos foram inteiramente revisados e atualizados para incluir os avanços mais importantes na área e a informação necessária para um livro de bioquímica moderno. Entre os tópicos novos e atualizados nesta edição estão:

- Evolução prebiótica, fumarolas negras e o mundo do RNA (Capítulo 1)
- Proteínas desordenadas intrinsecamente (Capítulo 4)
- Análogos de estados de transição e inibição irreversível (Capítulo 6)
- Vias da coagulação sanguínea no contexto da regulação enzimática (Capítulo 6)

Ligação da extremidade carboxiterminal da p53, intrinsecamente desordenada, aos seus parceiros

- Distribuição lipídica assimétrica nas bicamadas (Capítulo 11)
- Papel das proteínas da superfamília BAR na curvatura da membrana (Capítulo 11)
- Proteínas de suporte (AKAPS e outras) e seus papéis reguladores (Capítulo 12)
- Espécies reativas de oxigênio como subprodutos e como sinais (Capítulo 19)
- Estrutura e função do centro metálico de geração de oxigênio no FSII (Capítulo 19)
- Formação e transporte de lipoproteínas nos mamíferos, incluindo o papel da SCREBP SCAP e Insig na regulação do colesterol (Capítulo 21)
- Integração do metabolismo de carboidratos e lipídeos por PPAR, SREBP, mTORC1 e LXR (Capítulos 21, 23)
- Creatina fosfato e o papel da creatina-cinase na mobilização do ATP para o citosol (Capítulo 23)
- Simbiontes microbianos no intestino e sua influência no metabolismo energético e na adipogênese (Capítulo 23)
- Nucleossomos: sua modificação e posicionamento e a estrutura de ordem superior da cromatina (Capítulo 24)
- DNA-polimerases e a recombinação homóloga eucariótica (Capítulo 25)
- Carregamento da RNA-polimerase II (Capítulo 26)
- A natureza resistente a mutações do código genético (Capítulo 27)
- Regulação da expressão gênica dos eucariotos pelos miRNA (Capítulos 26 e 28)
- As alças do DNA, o controle combinatório, o remodelamento da cromatina e a regulação positiva nos eucariotos (Capítulo 28)
- Regulação da iniciação da transcrição nos eucariotos (Capítulo 28)
- Receptores nucleares ligantes de esteroides (Capítulo 28)

## Novos métodos bioquímicos

Uma avaliação da bioquímica muitas vezes requer uma compreensão de como é obtida a informação. Alguns dos novos métodos e atualizações descritos nesta edição são:

- Moderno sequenciamento de proteínas de Sanger e espectrometria de massas (Capítulo 3)
- Espectrometria de massas aplicada à proteômica, à glicômica, à lipidômica e à metabolômica (Capítulos 3, 7 e 10)
- Microarranjos de oligossacarídeos para explorar as interações proteína-oligossacarídeo e o "código dos carboidratos" (Capítulo 7)
- Métodos genômicos modernos (Capítulo 9)
- Engenharia genética de organismos fotossintéticos (Capítulo 20)
- Uso de tomografia de emissão de pósitrons (PET) para visualizar tumores e tecido adiposo marrom (Capítulo 23)
- Desenvolvimento de linhagens bacterianas com códigos genéticos alterados, para a inserção de novos aminoácidos em sítios específicos nas proteínas (Capítulo 27)

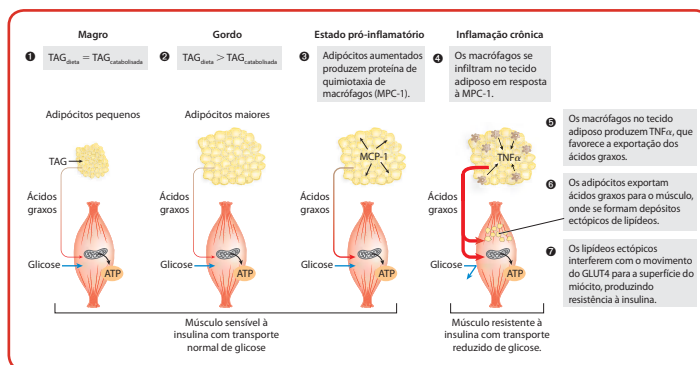
## Novas aplicações clínicas

Este ícone é utilizado em todo o livro para indicar temas de interesse clínico. Como professores, nosso objetivo é que os estudantes aprendam a bioquímica e compreendam sua relevância para uma vida e um planeta mais saudáveis. Muitas seções exploram o que sabemos sobre os mecanismos moleculares das doenças. Algumas das aplicações clínicas novas ou revisadas desta edição são:

- Quadro 4-6, Morte por enovelamento incorreto: doenças priônicas
- Síndromes de Paganini e de Ehlers-Danlos (Capítulo 4)
- Inibidores da protease do HIV e como os princípios enzimáticos básicos influenciam seus desenhos (Capítulo 6)
- Cascata da coagulação sanguínea e hemofilia (Capítulo 6)
- A cura da doença do sono africana com um inibidor enzimático suicida (Capítulo 6)
- Como os pesquisadores localizam os genes humanos envolvidos nas doenças hereditárias (Capítulo 9)
- Transportadores de resistência a multifármacos e sua importância na medicina clínica (Capítulo 11)
- Progressão do câncer colorretal em múltiplas etapas (Capítulo 12)
- Metabolismo do colesterol, doença cardiovascular e mecanismo de formação de placa na aterosclerose (Capítulo 21)
- Interação entre P-450 e fármacos (Capítulo 21)
- HMG-CoA-redutase (Capítulo 21) e Quadro 21-3, A hipótese lipídica e o desenvolvimento das estatinas.
- Quadro 24-1, A cura de doenças pela inibição das topoisomerases, descreve o uso de inibidores de topoisomerases no tratamento de câncer e infecções bacterianas, incluindo material sobre ciprofloxacina (o antibiótico efetivo contra antraz).
- Células-tronco (Capítulo 28)

## Tópico especial: compreensão do metabolismo por meio da obesidade e do diabetes

A obesidade e suas consequências para a saúde – doença cardiovascular e diabetes – estão se tornando epidêmicas no mundo, motivo pelo qual incluiu-se material novo sobre as conexões bioquímicas entre obesidade e saúde. O foco no diabetes proporciona um tópico integrado em todos os capítulos sobre metabolismo e seu controle; assim, espera-se que o tema inspire alguns estudantes a encontrar soluções para essa doença. Algumas das seções e quadros que destacam a interação entre metabolismo, obesidade e diabetes são:

- Diabetes não tratado produz acidose potencialmente letal (Capítulo 2)
- Quadro 7-1, Dosagem da glicose sanguínea no diagnóstico e no tratamento do diabetes, apresenta a glicação da hemoglobina e AGE e seus papéis na patologia do diabetes avançado
- A captação da glicose é deficiente no diabetes melito do tipo 1 (Capítulo 14)
- Os corpos cetônicos são produzidos em excesso durante o jejum e no diabetes (Capítulo 17)
- Algumas mutações no genoma mitocondrial causam doença (Capítulo 19)
- O diabetes pode ser resultado de defeitos nas mitocôndrias das células $\beta$ pancreáticas (Capítulo 19)
- O tecido adiposo produz glicerol-3-fosfato por gliceroneogênese (Capítulo 21)
- O diabetes melito origina-se por defeitos na produção ou na ação da insulina (Capítulo 23)
- Seção 23.4, A obesidade e a regulação da massa corporal, inclui uma nova discussão sobre o papel de TORC1 na regulação do crescimento celular
- Seção 23.5, Obesidade, síndrome metabólica e diabetes do tipo 2, discute o papel dos lipídeos ectópicos e da inflamação no desenvolvimento da resistência à insulina e o manejo do diabetes do tipo 2 com exercícios, dieta e medicação

Adipócitos com excesso de triacilgliceróis desencadeia inflamação no tecido gorduroso, deposição ectópica de lipídeos e resistência à insulina.

---

## Tópico especial: evolução

Cada vez que um bioquímico estuda uma via de desenvolvimento em nematódeos, identifica partes essenciais do centro ativo de uma enzima pela determinação de quais partes são conservadas entre as espécies ou procura o gene responsável por uma doença genética humana, ele está confiando na teoria da evolução. As agências de fomento apoiam o trabalho com nematódeos sabendo que os resultados serão relevantes para os humanos. A conservação de resíduos funcionais no sítio ativo de uma enzima transmite a história compartilhada por cada organismo no planeta. Com mais frequência, a procura por um gene responsável por uma doença é um exercício sofisticado de filogenética. A evolução é, portanto, um conceito fundamental para a nossa disciplina. Algumas das muitas seções e quadros que tratam da evolução incluem:

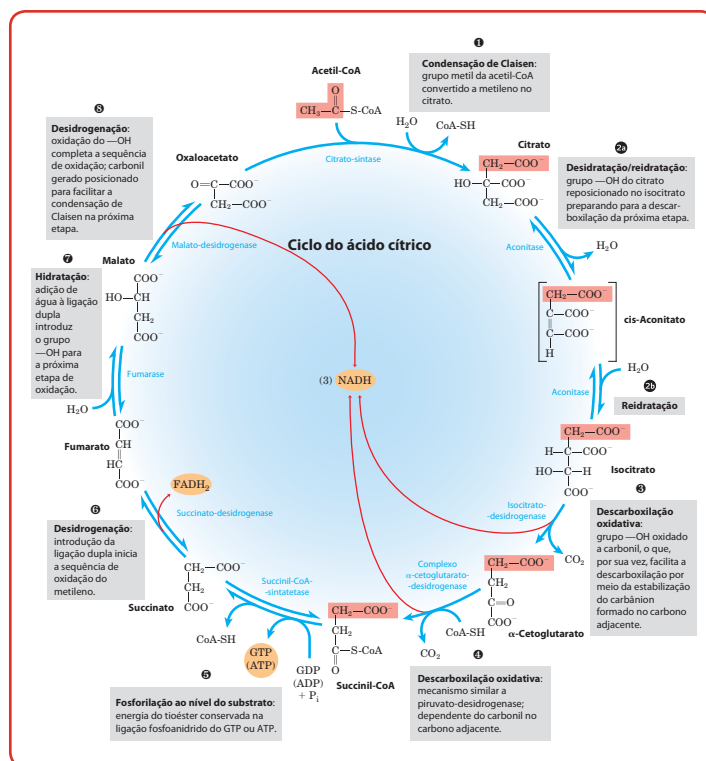
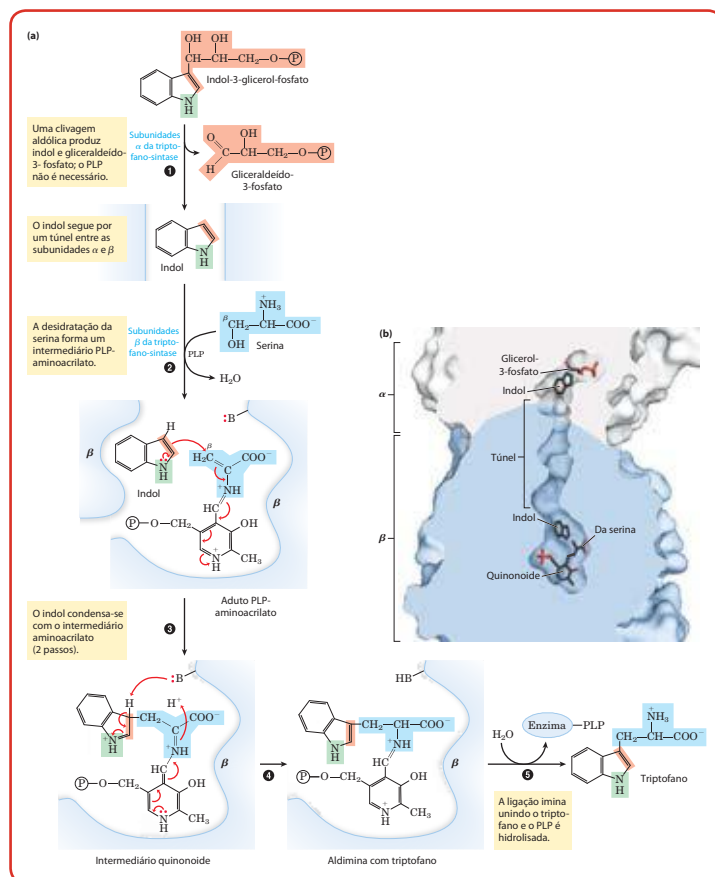
- Seção 1.5, Fundamentos evolutivos, discute como a vida pode ter evoluído e narra alguns dos marcos iniciais na evolução das células eucarióticas
- O sequenciamento genômico nos informa sobre nossa humanidade (Capítulo 9)
- Comparações genômicas ajudam a localizar genes envolvidos com doenças (Capítulo 9)
- As sequências genômicas nos informam sobre nosso passado e fornecem oportunidades para o futuro (Capítulo 9)
- Quadro 9-3, Conhecendo os neandertais
- Os transportadores ABC usam ATP para conduzir o transporte ativo de uma ampla variedade de substâncias (Capítulo 11)
- Os sistemas de sinalização das plantas têm alguns dos mesmos componentes utilizados pelos micróbios e mamíferos (Capítulo 12)
- As enzimas da $\beta$-oxidação de diferentes organelas divergiram durante a evolução (Capítulo 17)
- Seção 19.10, A evolução da fotossíntese oxigênica
- As mitocôndrias e os cloroplastos evoluíram a partir de bactérias endossimbióticas (Capítulo 19)
- Os fotossistemas I e II evoluíram a partir de fotossistemas bacterianos (Capítulo 19)
- A síntese de RNA oferece pistas importantes sobre a evolução bioquímica (Capítulo 26)
- Quadro 27-1, Exceções que confirmam a regra: variações naturais no código genético
- Quadro 27-2, De um mundo de RNA para um mundo de proteína
- Quadro 28-1, Sobre barbatanas, asas, bicos e outras curiosidades

---

## Marcas no ensino de *Lehninger*

Os estudantes que pela primeira vez entram em contato com a bioquímica frequentemente têm dificuldades com dois aspectos-chave da disciplina: abordar problemas quantitativos e recorrer aos seus conhecimentos de química orgânica para entender bioquímica. Eles também devem aprender uma linguagem complexa, com convenções que, em geral, não são apresentadas. Para ajudar os estudantes a lidarem com esses desafios, são fornecidos os seguintes auxílios para o estudo:

### Foco em lógica química

- Seção 13.2, **Lógica química e reações bioquímicas comuns**, discute os tipos comuns de reações bioquímicas que fundamentam todas as reações metabólicas, ajudando os estudantes a conectar a química orgânica com a bioquímica
- **NOVAS figuras de lógica química** ressaltam a conservação dos mecanismos e ilustram os padrões que tornam mais fácil o aprendizado das vias. As figuras de lógica química são fornecidas para cada uma das vias metabólicas centrais, incluindo a glicólise (Figura 14-3), o ciclo do ácido cítrico (Figura 16-7) e a oxidação dos ácidos graxos (Figura 17-9)

As reações do ciclo do ácido cítrico

- **Mecanismos-Figura** expõem descrições gradativas para ajudar os estudantes a entender o processo das reações.

  Essas figuras usam um conjunto consistente de convenções introduzidas e explicadas em detalhes junto com o primeiro mecanismo enzimático descrito (quimotripsina, p. 216-217).

Reação da triptofano-sintase

## Ferramentas para resolução de problemas

- **Exemplos de problemas resolvidos incluídos no texto** ajudam os estudantes a aumentar sua capacidade de resolver problemas quantitativos, revendo algumas das equações mais difíceis. Novos exemplos aparecem nos Capítulos 1, 2 e 19
- **Mais de 600 novos problemas no final dos capítulos (cerca de 25 novos)** fornecem aos estudantes uma oportunidade adicional de praticar o que aprenderam
- **Problemas de análise de dados** (ao final de cada capítulo), colaboração de Brian White da University of Massachusetts-Boston, estimulam os estudantes a resumir o que aprenderam e a aplicar seu conhecimento na interpretação de dados da literatura

## Convenções-chave

Muitas das convenções tão necessárias para a compreensão de cada tópico bioquímico e da literatura bioquímica estão destacadas. Essas **convenções-chave** incluem enunciados claros sobre muitas hipóteses e convenções que os alunos em tese devem saber, mas muitas vezes ninguém os informa a respeito (p. ex., as sequências peptídicas são escritas da extremidade aminoterminal para a carboxiterminal, da esquerda para a direita; as sequências nucleotídicas são escritas da extremidade 5′ para a 3′, da esquerda para a direita).

**PROBLEMA RESOLVIDO 19-2** **Estequiometria da produção de ATP: efeito do tamanho do anel c**

(a) Se as mitocôndrias *bovinas* têm 8 subunidades c por anel c, qual a razão predita de ATP formado por NADH oxidado? (b) Qual o valor predito para as mitocôndrias de *leveduras*, com 10 subunidades c? (c) Quais os valores comparáveis de elétrons que entram na cadeia respiratória a partir do $FADH_2$?

**Solução:** (a) A questão solicita a determinação de quantos ATP são produzidos por NADH. Essa é outra forma de pedir para calcularmos a razão P/O, ou $x$ na Equação 19–11. Se o anel c tem 8 subunidades c, então um rotação completa transferirá 8 prótons para a matriz e produzirá 3 moléculas de ATP. Porém, esta síntese também requer o transporte de 3 $P_i$ para dentro da matriz, ao custo de 1 próton cada, acrescentando mais 3 prótons ao número requerido. Isso leva o custo total para (11 prótons) / (3 ATP) = 3,7 prótons/ATP. O valor consensual para o número de prótons bombeados para fora por par de elétrons transferidos do NADH é 10 (ver Figura 19–19). Assim, oxidar 1 NADH produz (10 prótons)/(3,7 prótons/ATP) = 2,7 ATP.

(b) Se o anel c tem 10 subunidades c, então uma rotação completa transferirá 10 prótons para a matriz e produzirá 3 moléculas de ATP. Acrescentando os 3 prótons para transportar os 3 $P_i$ para dentro da matriz traz o custo total para (13 prótons)/(3 ATP) = 4,3 prótons/ATP. A oxidação de 1 NADH produz (10 prótons)/(4,3 prótons/ATP) = 2,3 ATP.

(c) Quando os elétrons entram na cadeia respiratória a partir do $FADH_2$ (na ubiquinona), apenas 6 prótons estão disponíveis para impulsionar a síntese de ATP. Isso muda os cálculos para as mitocôndrias bovinas para (6 prótons)/(3,7 prótons/ATP) = 1,6 ATP por par de elétrons do $FADH_2$. Para as mitocôndrias de leveduras, o cálculo é (6 prótons)/(4,3 prótons/ATP) = 1,4 ATP por par de elétrons do $FADH_2$.

Esses valores calculados de $x$ ou da razão P/O definem uma faixa que inclui os valores experimentais de 2,5 ATP/NADH e 1,5 ATP/$FADH_2$, e, portanto, esses valores serão usados ao longo deste livro.

## Recursos *on-line*

- Visite a área do professor em www.grupoa.com.br para ter acesso a Power Point (em português).
- Em www.whfreeman.com/lehninger6e há recursos *on-line* (em inglês) para estudantes e professores. Os ícones no texto indicam a disponibilidade da animação relevante, gráfico dinâmico com tutorial da estrutura molecular.

## Agradecimentos

Este livro é o resultado de um esforço conjunto, e sua produção seria impossível sem a equipe da W.H. Freeman, que nos apoiou em todas as etapas. Susan Moran (editora sênior de desenvolvimento), Susan Winslow (editora) e Lauren Schultz (editora sênior de aquisições) ajudaram a desenvolver o plano de revisão desta edição, fizeram muitas sugestões úteis, nos incentivaram e tentaram corajosamente (e quase sempre com sucesso) manter-nos dentro do cronograma. Matthew Tontonoz (editor de desenvolvimento) nos forneceu opiniões extremamente úteis sobre muitos capítulos. Nossa editora de projetos, Jane O'Neill, de alguma forma manteve o livro em andamento ao longo da produção, apesar dos nossos prazos e mudanças de última hora. Agradecemos à diretora de arte Diana Blume pelo seu talento artístico no miolo e na capa do livro. Agradecemos o trabalho dos antigos e atuais revisores, entre eles Karen Taschek, Liz Geller e Linda Strange. Apesar de Linda não ter revisado esta edição, suas contribuições desde a 1ª até a 5ª edição são ainda claramente evidentes no texto. Agradecemos ao gerente de pesquisa de fotos Ted Szczepanski e à pesquisadora de fotos Elyse Rieder por sua ajuda na localização das imagens e a Courtney Lyons pela ajuda na direção das revisões e por fornecer assistência administrativa em muitas ocasiões. Também agradecemos a Allison Michael, editora de mídia, por reunir os componentes da mídia, cada vez mais importantes, para acompanhar o texto. Nossa gratidão vai também para Debbie Clare, diretora associada de marketing, por sua criatividade e bom humor na coordenação das vendas e no marketing. Um agradecimento muito especial vai para Kate Parker, que supervisionou as últimas três edições deste projeto e contribuiu muito para seu sucesso, antes de mudar de atividade; sentiremos falta de seus conhecimentos, seu humor e seu excelente gosto por restaurantes.

Em Madison, Brook Soltvedt é (e tem sido em todas as edições nas quais trabalhamos) nossa editora e crítica de primeira linha. Ela é a primeira a ver os originais dos capítulos, ajuda na escrita e no desenvolvimento das ilustrações, garante consistência interna ao conteúdo e à nomenclatura e mantém nosso desafio incitando-nos de maneira mais ou menos gentil. Shelley Lusetti, da New Mexico State University, leu o texto, como o fez na 4ª e na 5ª edição, e fez muitas sugestões que melhoraram o livro.

A parte visual desta edição, incluindo os novos gráficos moleculares, foi executada em Madison por Adam Steinberg, o qual nos deu sugestões valiosas que levaram a ilustrações melhores e mais claras. Sentimo-nos muito felizes por termos Brook, Shelley e Adam em nossa equipe, parceiros tão talentosos.

Também estamos profundamente agradecidos a Brian White, da University of Massachusetts-Boston, que escreveu as questões no final de cada capítulo.

Muitos colegas tiveram um papel especial por seu interesse no projeto e por suas intervenções oportunas. Destacamos: Jeffrey D. Esko, da University of California, San Diego, e Jack Kirsch e seus alunos da University of California, Berkeley. Charles G. Hoogstraten da Michigan State University fez muitos comentários incisivos e úteis sobre o texto e as figuras. Também agradecemos a Jeffrey A. Cohlberg da California State University em Long Beach por seus comentários críticos. Muitos outros nos auxiliaram a dar forma a esta 6ª edição com seus comentários, sugestões e críticas. Somos profundamente gratos a todos eles:

Alan Attie, *University of Wisconsin–Madison*
Alejandra Stenger, *University of Illinois, Urbana-Champaign*
Allen Nicholson, *Temple University*
Amy Stockert, *Ohio Northern University*
Andy LiWang, *University of California, Merced*
Brent Feske, *Armstrong Atlantic State University*
Brian Bothner, *Montana State University*
Burt Goldberg, *New York University*
Chuan Xiao, *University of Texas, El Paso*
David Hurley, *Gatton College of Pharmacy, ETSU*
David Merkler, *University of South Florida*
Debra Moriarity, *University of Alabama: Huntsville*
Dmitry Kolpashchikov, *University of Central Florida*
Donald Ourth, *University of Memphis*
Douglas Julin, *University of Maryland*
Douglas Root, *University of North Texas*
Eric Hegg, *Michigan State University*
Gerald Feigenson, *Cornell University*
Glenda Gillaspy, *Virginia Tech University*
Gregory Raner, *University of North Carolina, Greensboro*
Greta Giles, *Georgia Gwinnett College*
Hunter Moseley, *University of Louisville*
James Blankenship, *Cornell University*
James Gober, *University of California, Los Angeles*
James Ntambi, *University of Wisconsin–Madison*
Jeff DeJong, *University of Texas, Dallas*
Johannes Rudolph, *University of Colorado*
Jon Stoltzfus, *Michigan State University*
Joseph Jez, *Washington University in St. Louis*
Joseph Provost, *Minnesota State University, Moorhead*
Julian Snow, *University of the Sciences*
Julie Gosse, *University of Maine*
Justin Hines, *Lafayette College*
Keith Dunker, *Indiana University*
Kelly Elkins, *Metropolitan State College of Denver*
Kelly Johanson, *Xavier University of Louisiana*
Kenneth Balazovich, *University of Michigan*
Kerry Smith, *Clemson University*
Kevin Siebenlist, *Marquette University*
Laura Zapanta, *University of Pittsburgh*
Laurens Anderson, *University of Wisconsin–Madison*
Lesley Greene, *Old Dominion University*
Lisa Rezende, *University of Arizona*
Marcello Forconi, *College of Charleston*
Margaret Glasner, *Texas A&M University*
Mark Kearley, *Florida State University*
Mary Bryk, *Texas A&M University*
Michael Mendenhall, *University of Kentucky*
Michael Yaffe, *Massachusetts Institute of Technology*
Michele McGuirl, *The University of Montana*
Min-Hao Kuo, *Michigan State University*
Neil Osheroff, *Vanderbilt University School of Medicine*
Nicole LaRonde-LeBlanc, *University of Maryland*

Peter Hinkle, *Cornell University*
Phillip Ryals, *University of West Florida*
Pui Ho, *Colorado State University*
Richard Amasino, *University of Wisconsin–Madison*
Scott Lefler, *Arizona State University*
Sharada Buddha, *Saint Xavier University*
Terry Platt, *University of Rochester*
Thomas Marsh, *University of St. Thomas*
Toni Vidal-Puig, *University of Cambridge*
Tracey Boncher, *Ferris State College of Pharmacy*
Wendy Pogozelski, *State University of New York, Geneseo*
Wilson Francisco, *Arizona State University*

Não temos espaço aqui para agradecer a todas as pessoas cujos esforços contribuíram para o desenvolvimento deste livro. Oferecemos nosso sincero agradecimento – e o livro pronto que eles ajudaram a completar. Assumimos, é claro, total responsabilidade por eventuais incorreções.

Queremos agradecer, de modo especial, aos nossos alunos da University of Wisconsin-Madison por suas inúmeras sugestões e comentários. Se alguma coisa no livro não estiver bem, eles não deixarão de nos informar. Somos muito gratos aos estudantes e ao pessoal de nossos grupos de pesquisa que nos ajudaram a equilibrar as demandas com o nosso tempo; aos nossos colegas do Departamento de Bioquímica da University of Wisconsin-Madison, que nos ajudaram com conselhos e críticas, e a muitos estudantes e professores que nos escreveram para sugerir formas de melhorar o livro. Esperamos que nossos leitores continuem nos proporcionando estímulo para futuras edições.

Finalmente, expressamos nossa profunda gratidão às nossas esposas, Brook e Beth, e a nossas famílias, que tiveram extraordinária paciência e nos apoiaram na redação do livro.

**David L. Nelson**
**Michael M. Cox**

# Sumário



# Sumário Detalhado

1

# Fundamentos da Bioquímica



Há cerca de catorze bilhões de anos, o universo surgiu como uma explosão cataclísmica de partículas subatômicas quentes e ricas em energia. Os elementos mais simples (hidrogênio e hélio) se formaram em segundos. À medida que o universo se expandia e esfriava, o material condensava sob a influência da gravidade para formar estrelas. Algumas estrelas se tornaram enormes e então explodiram como supernovas, liberando a energia necessária para promover a fusão de núcleos atômicos mais simples em mais complexos. Átomos e moléculas formaram nuvens de partículas de pó e a sua agregação levou, por fim, à formação de rochas, planetoides e planetas. Dessa maneira, foram produzidos, no decurso de bilhões de anos, a própria Terra e os elementos químicos nela encontrados hoje. Cerca de quatro bilhões de anos atrás, surgiu a vida – microrganismos simples com a capacidade de extrair energia de compostos químicos e, mais tarde, da luz solar. Essa energia já era usada por eles para produzir um conjunto vasto de **biomoléculas** mais complexas a partir dos elementos simples e compostos encontrados na superfície terrestre. Os seres humanos e todos os outros organismos vivos são feitos de poeira estelar.

A bioquímica questiona como as extraordinárias propriedades dos organismos vivos se originaram a partir de milhares de biomoléculas diferentes. Quando essas moléculas são isoladas e examinadas individualmente, elas seguem todas as leis físicas e químicas que descrevem o comportamento da matéria inanimada. Todos os processos que ocorrem nos organismos vivos também seguem todas as leis físicas e químicas. O estudo da bioquímica mostra como o conjunto de moléculas inanimadas que constituem os organismos vivos interage para manter e perpetuar a vida exclusivamente pelas leis físicas e químicas que regem o universo inanimado.

De fato, os organismos vivos têm propriedades extraordinárias, propriedades que os distinguem muito das outras porções de matéria. Mas quais são essas propriedades peculiares dos organismos vivos?

**Alto grau de complexidade química e organização microscópica**. Milhares de moléculas diferentes formam as intricadas estruturas celulares internas (**Figura 1-1a**). Elas incluem polímeros muito longos, cada qual com sua sequência característica de subunidades, sua estrutura tridimensional única e seletividade muito específica de parceiros para interação na célula.

**Sistemas para extrair, transformar e utilizar a energia do ambiente** (Figura 1-1b), permitem aos organismos construir e manter suas intricadas estruturas, assim como realizar trabalho mecânico, químico, osmótico e elétrico, o que neutraliza a tendência de toda a matéria de decair para um estado mais desorganizado, entrando assim em equilíbrio com seu ambiente.

**Funções definidas para cada um dos componentes de um organismo e interações reguladas entre eles**. Isso é válido não somente para as estruturas macroscópicas, como folhas e ramos ou corações e pulmões, mas também para as estruturas intracelulares microscópicas e os compostos químicos individuais. A interação entre os componentes químicos de um organismo vivo é dinâmica; mudanças em um componente causam mudanças coordenadas ou compensatórias em outro, com o todo manifestando uma característica além daquelas de suas partes individuais. O conjunto de moléculas realiza um programa, cujo resultado final é a reprodução e a autopreservação do conjunto de moléculas – em resumo, a vida.

**Mecanismos para sentir e responder às alterações no seu ambiente**. Os organismos constantemente se ajustam a essas mudanças por adaptações de sua química interna ou de sua localização no ambiente.

**Capacidade para se autorreplicar e automontar com precisão** (Figura 1-1c). Uma célula bacteriana isolada disposta em meio nutritivo estéril pode dar origem, em 24 horas, a um bilhão de "filhas" idênticas. Cada cé-

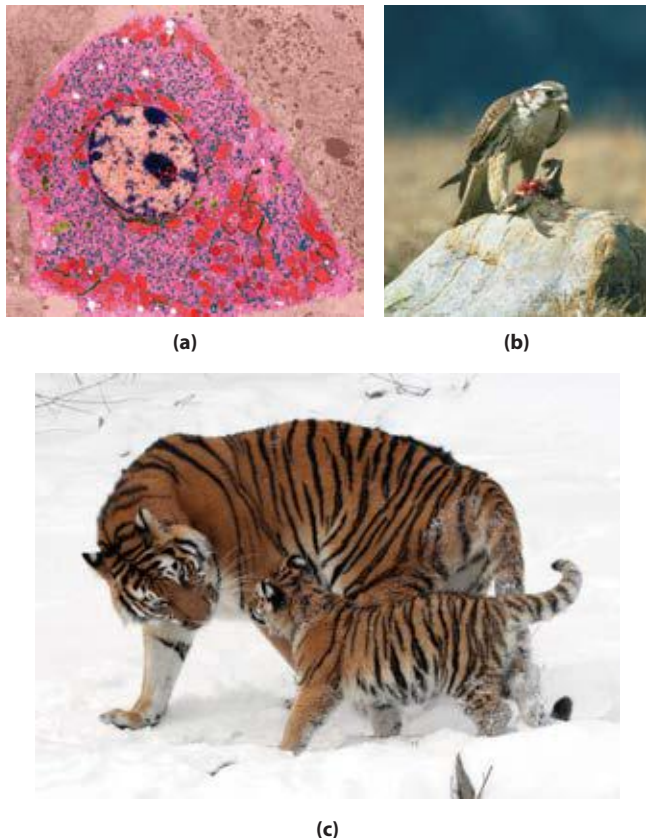



FIGURA 1-1 **Algumas características da matéria viva.** **(a)** A complexidade microscópica e a organização são visíveis nesse corte colorido artificialmente de tecido muscular de vertebrado, produzido pelo microscópio eletrônico. **(b)** Um falcão da pradaria capta nutrientes consumindo uma ave menor. **(c)** A reprodução biológica ocorre com uma fidelidade quase perfeita.

lula contém milhares de moléculas diferentes, muitas extremamente complexas; mas cada bactéria é uma cópia fiel da original, sendo sua construção totalmente direcionada a partir da informação contida no material genético da célula original. Em uma escala maior, a prole de um animal vertebrado mostra uma semelhança marcante com a dos seus pais, também como consequência da herança dos genes parentais.

**Capacidade de se alterar ao longo do tempo por evolução gradual**. Os organismos alteram suas estratégias de vida herdadas, a passos muito pequenos, para sobreviver em circunstâncias novas. O resultado de eras de evolução é uma enorme diversidade de formas de vida, muito diferentes superficialmente (**Figura 1-2**), mas fundamentalmente relacionadas por sua ancestralidade comum. Essa unidade fundamental dos organismos vivos se reflete na semelhança das sequências gênicas e nas estruturas das proteínas.

Apesar dessas propriedades comuns e da unidade fundamental da vida que elas mostram, é difícil fazer generalizações sobre os organismos vivos. A Terra tem uma enorme diversidade de organismos. Cada um dos inúmeros hábitats, das fontes termais à tundra do Ártico, dos intestinos dos animais (hábitat de muitos microrganismos) às casas de estudantes, existe um conjunto amplo de adaptações bioquímicas muito específicas nos organismos que vivem nesses hábitats, adaptações que foram atingidas partindo-se de um arcabouço químico comum. O texto deste livro, para maior clareza, às vezes se arrisca a fazer algumas generalizações, as quais, embora não perfeitas, mostram-se úteis. Por vezes também aponta algumas exceções a essas generalizações, as quais também podem se mostrar esclarecedoras.

FIGURA 1-2 **Diferentes organismos vivos compartilham características químicas comuns.** Aves, animais selvagens, plantas e microrganismos do solo compartilham com os humanos as mesmas unidades estruturais básicas (células) e os mesmos tipos de macromoléculas (DNA, RNA, proteínas) feitas dos mesmos tipos de subunidades monoméricas (nucleotídeos, aminoácidos). Eles utilizam as mesmas vias para a síntese dos componentes celulares, compartilham o mesmo código genético e provêm dos mesmos ancestrais evolutivos. Na figura é mostrado um detalhe de *O jardim do Éden*, por Jan van Kessel – o Jovem (1626-1679).

A bioquímica descreve em termos moleculares as estruturas, os mecanismos e os processos químicos compartilhados por todos os organismos e estabelece princípios de organização que são a base da vida em todas as suas formas, princípios esses referidos como *a lógica molecular da vida.* Embora a bioquímica proporcione importantes esclarecimentos e aplicações práticas na medicina, na agricultura, na nutrição e na indústria, sua preocupação primordial é com o milagre da vida em si.

Neste capítulo introdutório, é feita uma revisão dos fundamentos celulares, químicos, físicos e genéticos da bioquímica e do importante princípio da evolução – como a vida emergiu e evoluiu para essa diversidade de organismos de hoje. À medida que você avançar na leitura do livro, perceberá a utilidade de retomar este capítulo de tempos em tempos para refrescar a sua memória sobre esse material básico.

## 1.1 Fundamentos celulares

A unidade e a diversidade dos organismos se tornam aparentes mesmo em nível celular. Os menores organismos

consistem em células isoladas e são microscópicos. Os organismos multicelulares maiores têm muitos tipos celulares diferentes, os quais variam em tamanho, forma e função especializada. Apesar dessas diferenças óbvias, todas as células dos organismos, desde o mais simples ao mais complexo, compartilham determinadas propriedades fundamentais, que podem ser vistas em nível bioquímico.

## As células são as unidades estruturais e funcionais de todos os organismos vivos

Células de todos os tipos compartilham algumas características estruturais comuns (**Figura 1-3**). A **membrana plasmática** define o contorno da célula, separando seu conteúdo do ambiente. Ela é composta por moléculas de lipídeos e proteínas que formam uma barreira fina, resistente, flexível e hidrofóbica ao redor da célula. A membrana é uma barreira para a passagem livre de íons inorgânicos e para a maioria de outros compostos carregados ou polares. Proteínas de transporte na membrana plasmática permitem a passagem de determinados íons e moléculas; proteínas receptoras transmitem sinais para o interior da célula; e enzimas de membrana participam em algumas rotas de reações. Como os lipídeos individuais e as proteínas da membrana não estão covalentemente ligados, toda a estrutura é extraordinariamente flexível, permitindo mudanças na forma e no tamanho da célula. À medida que a célula cresce, novas moléculas de proteínas e de lipídeos são inseridas na membrana plasmática; a divisão celular produz duas células, cada qual com sua própria membrana. O crescimento e a divisão celular (fissão) ocorrem sem perda da integridade da membrana.

O volume interno envolto pela membrana plasmática, o **citoplasma** (**Figura 1-3**), é composto por uma solução aquosa, o **citosol**, e uma grande variedade de partículas em suspensão com funções específicas. Esses componentes particulados (organelas envoltas por membrana como mitocôndria e cloroplastos; estruturas supramoleculares como **ribossomos** e **proteossomos**, os sítios de síntese e degradação das proteínas) se sedimentam quando o citoplasma é centrifugado a 150.000 *g* (*g* é aceleração da gravidade na superfície terrestre). O que sobra como fluido sobrenadante é o citosol, solução aquosa altamente concentrada que contém enzimas e as moléculas de RNA que as codificam; os componentes (aminoácidos e nucleotídeos) que formam essas macromoléculas; centenas de moléculas orgânicas pequenas chamadas de **metabólitos**, intermediários em rotas biossintéticas e degradativas; **coenzimas**, compostos essenciais em muitas reações catalisadas por enzimas; e íons inorgânicos.

**FIGURA 1-3 As características universais das células vivas.** Todas as células têm núcleo ou nucleoide, membrana plasmática e citoplasma. O citosol é definido como a porção do citoplasma que permanece no sobrenadante após rompimento suave da membrana plasmática e centrifugação do extrato resultante a 150.000 *g* por 1 hora. As células eucarióticas têm uma variedade de organelas contidas por membranas (mitocôndrias e cloroplastos) e partículas maiores (ribossomos, p. ex.), que são sedimentadas por esta centrifugação e podem ser recuperadas do precipitado.

Todas as células têm, pelo menos em algum momento de sua vida, um **nucleoide** ou **núcleo**, onde o **genoma** – o conjunto completo de genes composto por DNA – é replicado e armazenado com suas proteínas associadas. Em bactérias e em arqueias, o nucleoide não é separado do citoplasma por uma membrana; o núcleo, nos **eucariotos**, é confinado dentro de uma dupla membrana, o envelope nuclear. As células com envelope nuclear compõem o grande domínio dos Eukarya (do grego *eu,* "verdade", e *karyon,* "núcleo"). Os microrganismos sem membrana nuclear, antes classificados como **procariontes** (do grego *pro*, "antes"), são agora reconhecidos como pertencentes a dois grupos muito distintos: Bacteria e Archaea, descritos a seguir.

## As dimensões celulares são limitadas pela difusão

A maioria das células é microscópica, invisível a olho nu. As células dos animais e das plantas têm um diâmetro geralmente de 5 a 100 $\mu$m, e muitos microrganismos unicelulares têm comprimento de 1 a 2 $\mu$m (ver na face interna da contracapa as informações sobre as unidades e suas abreviaturas). O que limita as dimensões de uma célula? O limite inferior provavelmente é determinado pelo número mínimo de cada tipo de biomolécula requerido pela célula. As menores células, certas bactérias conhecidas como micoplasmas, têm diâmetro de 300 nm e volume de cerca de $10^{-14}$ mL. Um único ribossomo bacteriano tem 20 nm na sua dimensão mais longa, de forma que poucos ribossomos ocupam uma fração substancial do volume de uma célula de micoplasma.

O limite superior de tamanho celular provavelmente é determinado pela taxa de difusão das moléculas de soluto nos sistemas aquosos. Por exemplo, uma célula bacteriana que depende de reações de consumo de oxigênio para extração de energia deve obter oxigênio molecular, por difusão, a partir do ambiente através de sua membrana plasmática. A célula é tão pequena, e a relação entre sua área de superfície e seu volume é tão grande, que cada parte do seu citoplasma é facilmente alcançada pelo $O_2$ que se difunde para dentro dela. Com o aumento do tamanho celular, no entanto, a relação área-volume diminui, até que o metabolismo consuma $O_2$ mais rapidamente do que o que pode ser suprido por difusão. Assim, o metabolismo que requer $O_2$ torna-se impossível quando o tamanho da célula aumenta além de certo ponto, estabelecendo um limite superior teórico para o tamanho das células. O oxigênio é somente uma entre muitas espécies moleculares de baixo peso que precisam difundir de fora para várias regiões do seu interior, e o mesmo argumento da razão área-volume se aplica a cada uma delas.

**FIGURA 1-4** **Filogenia dos três grupos da vida.** As relações filogenéticas são frequentemente representadas por uma "árvore genealógica" deste tipo. A base para esta árvore é a semelhança na sequência nucleotídica dos RNA dos ribossomos de cada grupo; a distância entre os ramos representa o grau de diferença entre duas sequências; quanto mais similar for a sequência, mais próxima é a localização dos ramos. As árvores filogenéticas também podem ser construídas a partir de semelhanças na sequência de aminoácidos de uma única proteína entre as espécies. Por exemplo, as sequências da proteína GroEL (proteína bacteriana que atua no enovelamento proteico) são comparadas para gerar a árvore da Figura 3-35. A árvore da Figura 3-36 é a árvore "consenso", que usa várias comparações como estas para fazer a melhor estimativa do relacionamento evolutivo de um grupo de organismos.

## Existem três grupos distintos de vida

Todos os organismos vivos se enquadram em três grandes grupos (grupos) que definem os três ramos da árvore evolucionária da vida que se originou a partir de um ancestral comum (**Figura 1-4**). Dois grandes grupos de microrganismos unicelulares podem ser distinguidos em bases genéticas e bioquímicas: **Bacteria** e **Archaea**. As bactérias habitam o solo, as águas superficiais e os tecidos de organismos vivos ou em decomposição. Muitas das arqueias, reconhecidas na década de 1980 por Carl Woese como um grupo distinto, habitam ambientes extremos – lagos de sais, fontes termais, pântanos altamente ácidos e profundezas do oceano. As evidências disponíveis sugerem que Bacteria e Archaea divergiram cedo na evolução. Todos os organismos eucariontes, que formam o terceiro domínio, **Eukarya**, evoluíram a partir do mesmo ramo que deu origem a Archaea; por isso, os eucariontes são mais proximamente relacionados às archaeas do que às bactérias.

Dentro dos domínios Archaea e Bacteria existem subgrupos distinguíveis por seus hábitats. Nos hábitats **aeróbios** com suprimento abundante de oxigênio, alguns organismos residentes obtêm energia pela transferência de elétrons das moléculas de combustível para o oxigênio dentro da célula. Outros ambientes são **anaeróbios**, praticamente desprovidos de oxigênio, e os microrganismos adaptados a esses ambientes obtêm energia pela transferência de elétrons para nitrato (formando $N_2$), sulfato (formando $H_2S$) ou $CO_2$ (formando $CH_4$). Muitos organismos que evoluíram em ambientes anaeróbios são anaeróbios *obrigatórios*: morrem quando expostos ao oxigênio. Outros são anaeróbios *facultativos*, capazes de viver com ou sem oxigênio.

## Os organismos diferem amplamente pelas suas fontes de energia e precursores biossintéticos

É possível classificar os organismos pela maneira como obtêm a energia e o carbono de que necessitam para sintetizar o material celular (conforme resumido na **Figura 1-5**). Existem duas categorias amplas com base nas fontes de energia: **fototróficos** (do grego *trophe*, "nutrição"), que captam e usam a luz solar, e **quimiotróficos**, que obtêm sua energia pela oxidação de um combustível químico. Alguns quimiotróficos oxidam combustíveis inorgânicos – por exemplo, $HS^-$ a $S^0$ (enxofre elementar), $S^0$ a $SO_4^-$ $NO_2^-$ a $NO_3^-$, ou $Fe^{2+}$ a $Fe^{3+}$. Os fototróficos e os quimiotróficos podem ser subdivididos ainda mais: os que podem sintetizar todas as suas biomoléculas diretamente do $CO_2$ (**autotróficos**) e os que requerem nutrientes orgânicos previamente formados por outros organismos (**heterotróficos**). É possível descrever o modo de nutrição de um organismo pela combinação desses termos. Por exemplo, cianobactérias são fotoautotróficas; humanos são quimio-heterotróficos. Distinções ainda mais sutis podem ser feitas, pois muitos organismos podem obter energia e carbono de mais de uma fonte sob diferentes condições ambientais ou de desenvolvimento.

## Células bacterianas e arqueanas compartilham propriedades comuns, mas diferem em aspectos importantes

*Escherichia coli*, a bactéria mais estudada, é geralmente um habitante inofensivo do trato intestinal humano. A célula de *E. coli* (**Figura 1-6a**) é um ovoide com cerca de 2 $\mu$m de comprimento e um pouco menos de 1 $\mu$m de diâmetro,

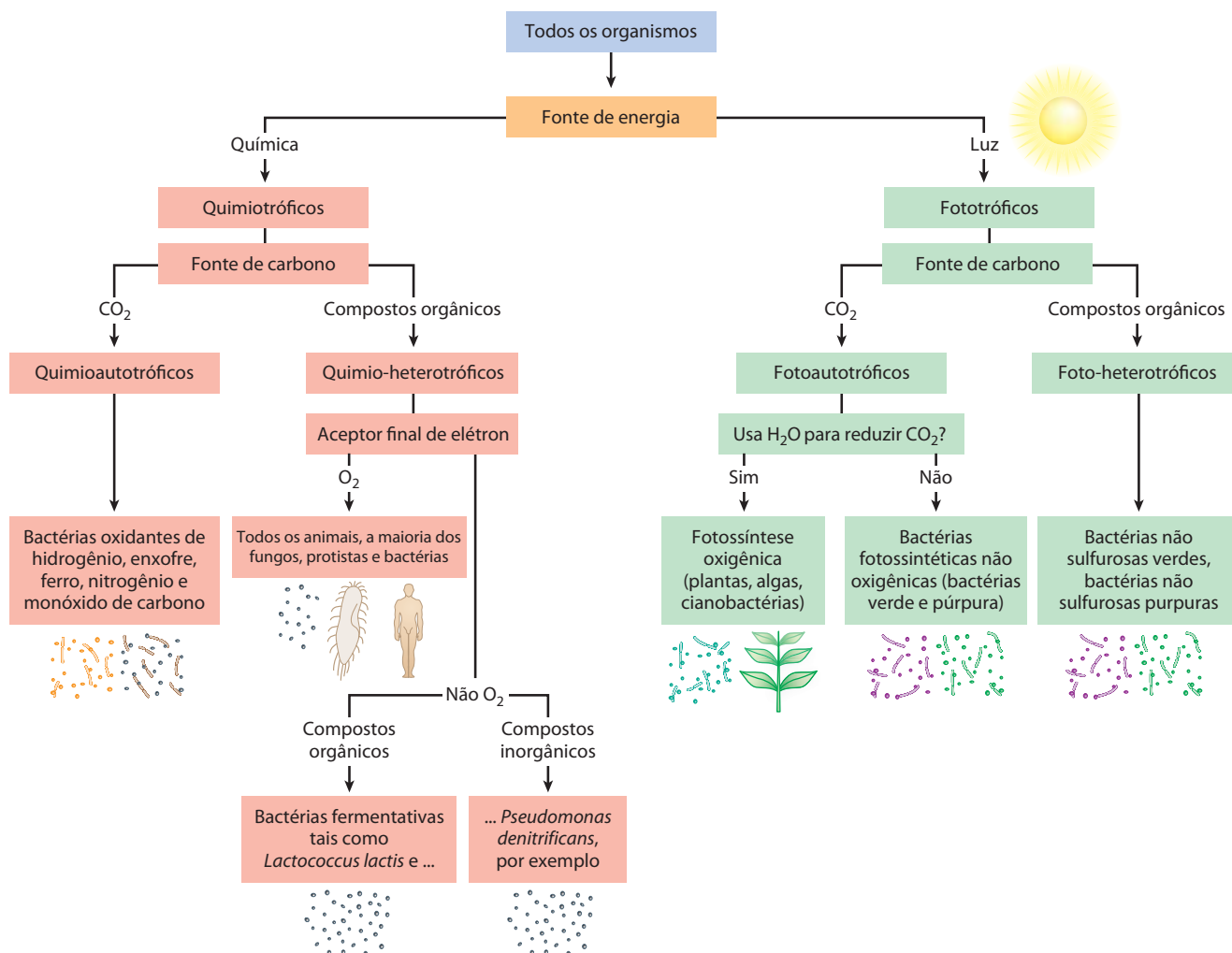



**FIGURA 1-5** Todos os organismos podem ser classificados de acordo com a fonte de energia (luz solar ou compostos químicos oxidáveis) e pela fonte de carbono usada para a síntese do material celular.

mas outras bactérias podem ser esféricas ou ter forma de bastonete. Ela tem uma membrana externa protetora e uma membrana plasmática interna que envolve o citoplasma e o nucleoide. Entre a membrana interna e a externa existe uma fina, mas resistente, camada de um polímero de alto peso molecular (peptidoglicano) que confere à célula sua forma e rigidez. A membrana plasmática e as camadas externas a ela constituem o **envelope celular**. A membrana plasmática das bactérias consiste em uma bicamada fina de moléculas lipídicas impregnadas de proteínas. As membranas plasmáticas arqueanas têm arquitetura similar, mas os lipídeos podem ser acentuadamente diferentes das bactérias (ver Figura 10-12). Bactérias e arqueias têm especializações grupo-específicas em seus envelopes celulares (Figura 1-6b-d). Algumas bactérias, chamadas gram-positivas porque se coloram com o corante de Gram (desenvolvido por Hans Peter Gram em 1882), têm uma camada espessa de peptidoglicanos na parte externa da sua membrana plasmática, mas não apresentam uma membrana externa. Já as bactérias gram-negativas têm uma membrana externa composta de uma dupla camada lipídica na qual se encontram inseridos lipopolissacarídeos e proteínas chamadas porinas que proveem canais transmembrana para que compostos de baixo peso molecular e íons possam se difundir através dessa membrana externa. As estruturas na parte externa da membrana plasmática das arqueias diferem de organismo para organismo, mas eles também têm uma camada de peptidoglicanos ou proteínas que conferem rigidez aos seus envelopes celulares.

O citoplasma da *E. coli* contém cerca de 15.000 ribossomos, várias cópias (de 10 a milhares) de cada uma das aproximadamente 1.000 diferentes enzimas, talvez 1.000 compostos orgânicos de massa molecular menor do que 1.000 (metabólitos e cofatores), e uma variedade de íons inorgânicos. O nucleoide contém uma única molécula de DNA circular, e o citoplasma (como na maioria das bactérias) contém um ou mais segmentos de DNA circular chamados de **plasmídeos**. Na natureza, alguns plasmídeos conferem resistência a toxinas e antibióticos do ambiente. No laboratório, esses segmentos de DNA circular são práticos para a manipulação experimental e são ferramentas poderosas para a engenharia genética (ver Capítulo 9).

Outras espécies de Bacteria e também de Archaea contêm uma coleção similar de moléculas, mas cada espé-

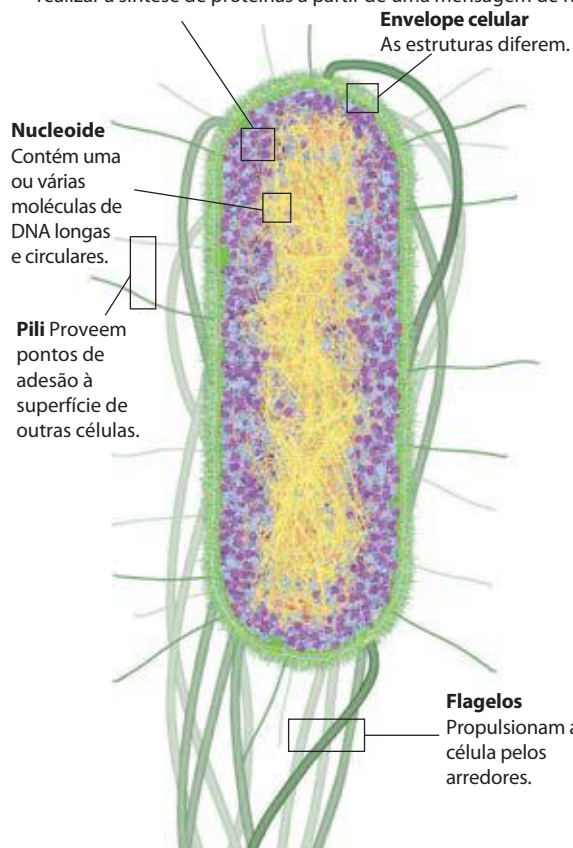
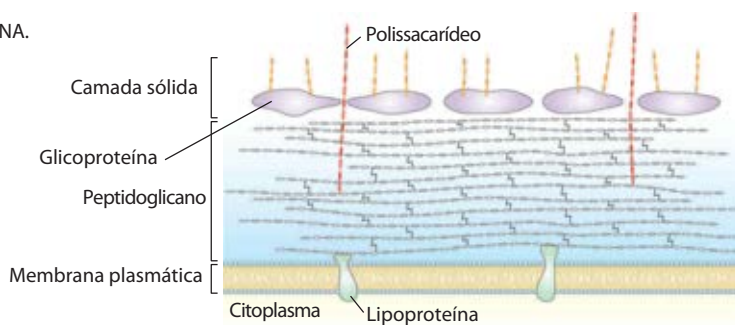
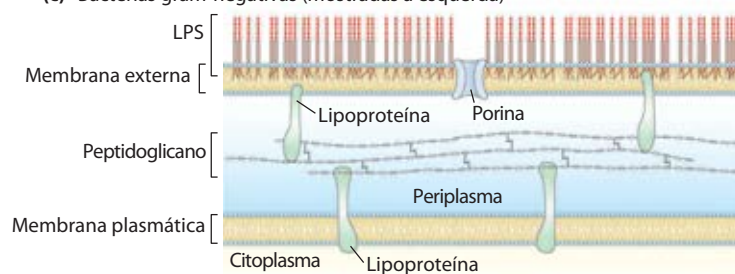
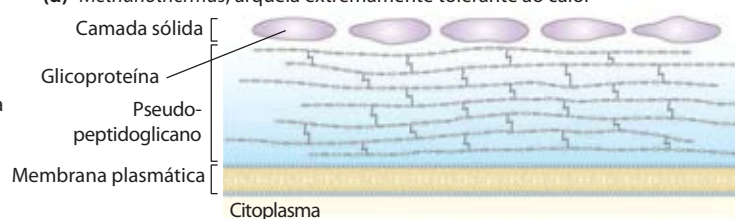



**FIGURA 1-6 Características estruturais comuns das células de bactérias e arqueias. (a)** Este desenho em escala da *E. coli* serve para ilustrar algumas características comuns. **(b)** O envelope celular das bactérias gram-positivas é uma simples membrana com uma camada grossa e rígida de peptidoglicanos em sua superfície externa. Uma variedade de polissacarídeos e outros polímeros complexos estão entrelaçados com os peptidoglicanos e, recobrindo o todo, ainda existe uma "camada sólida" e porosa de glicoproteínas. **(c)** *E. coli* é gram-negativa e tem uma dupla membrana. Sua membrana externa tem um lipopolissacarídeo (LPS) na superfície externa e fosfolipídeos na superfície interna. Esta membrana externa está impregnada de canais proteicas (porinas) que permitem a difusão de pequenas moléculas através delas, mas não de outras proteínas. A membrana interna, feita de fosfolipídeos e proteínas, é impermeável a ambos, às moléculas pequenas e grandes. Entre a membrana interna e externa, no periplasma, existe uma camada delgada de peptidoglicanos, que confere à célula forma e rigidez, mas que não retém o corante de Gram. **(d)**. As membranas arqueanas variam em estrutura e composição, mas todas têm membrana única cercada por uma camada externa que inclui uma estrutura tipo peptidoglicano, uma concha de proteínas porosas (camada sólida) ou ambas.

cie tem especializações físicas e metabólicas relacionadas ao nicho ambiental e fontes nutricionais. Cianobactérias, por exemplo, têm membranas internas especializadas em capturar energia da luz (Figura 19-67). Muitas arqueias vivem em ambientes extremos e têm adaptações bioquímicas para sobreviver em extremos de temperatura, pressão ou concentração de sal. Diferenças observadas na estrutura dos ribossomos deram a primeira indicação de que Bacteria e Archaea constituem grupos diferentes. A maioria das bactérias (inclusive *E. coli*) existe na forma de células individuais, mas muitas vezes associadas a biofilmes ou películas, nas quais inúmeras células se aderem umas às outras e ao mesmo tempo ao substrato sólido que fica junto ou próximo de uma superfície aquosa. Células de algumas espécies de bactérias (p. ex., mixobactéria) mostram um comportamento social simples, formando agregados multicelulares em resposta a sinais entre células vizinhas.

## As células eucarióticas têm uma grande variedade de organelas providas de membranas, que podem ser isoladas para estudo

As células eucarióticas típicas (**Figura 1-7**) são muito maiores do que as bactérias – em geral de 5 a 100 $\mu$m de diâmetro, com um volume de mil a um milhão de vezes maior do que o das bactérias. As características que distinguem os eucariotos são o núcleo e uma grande variedade de organelas envoltas por membranas com funções específicas. Essa relação de organelas inclui a **mitocôndria**, o sítio da maior parte das reações extratoras de energia da célula; o **retículo endoplasmático** e **aparelho de Golgi**, que desempenham papéis centrais na síntese e processamento de lipídeos e proteínas de membrana; **peroxissomos**, onde ácidos graxos de cadeia bem longa são oxidados; e **lisossomos**, preenchidos com enzimas digestivas para degradar os restos celulares não necessários. Além dessas organelas,

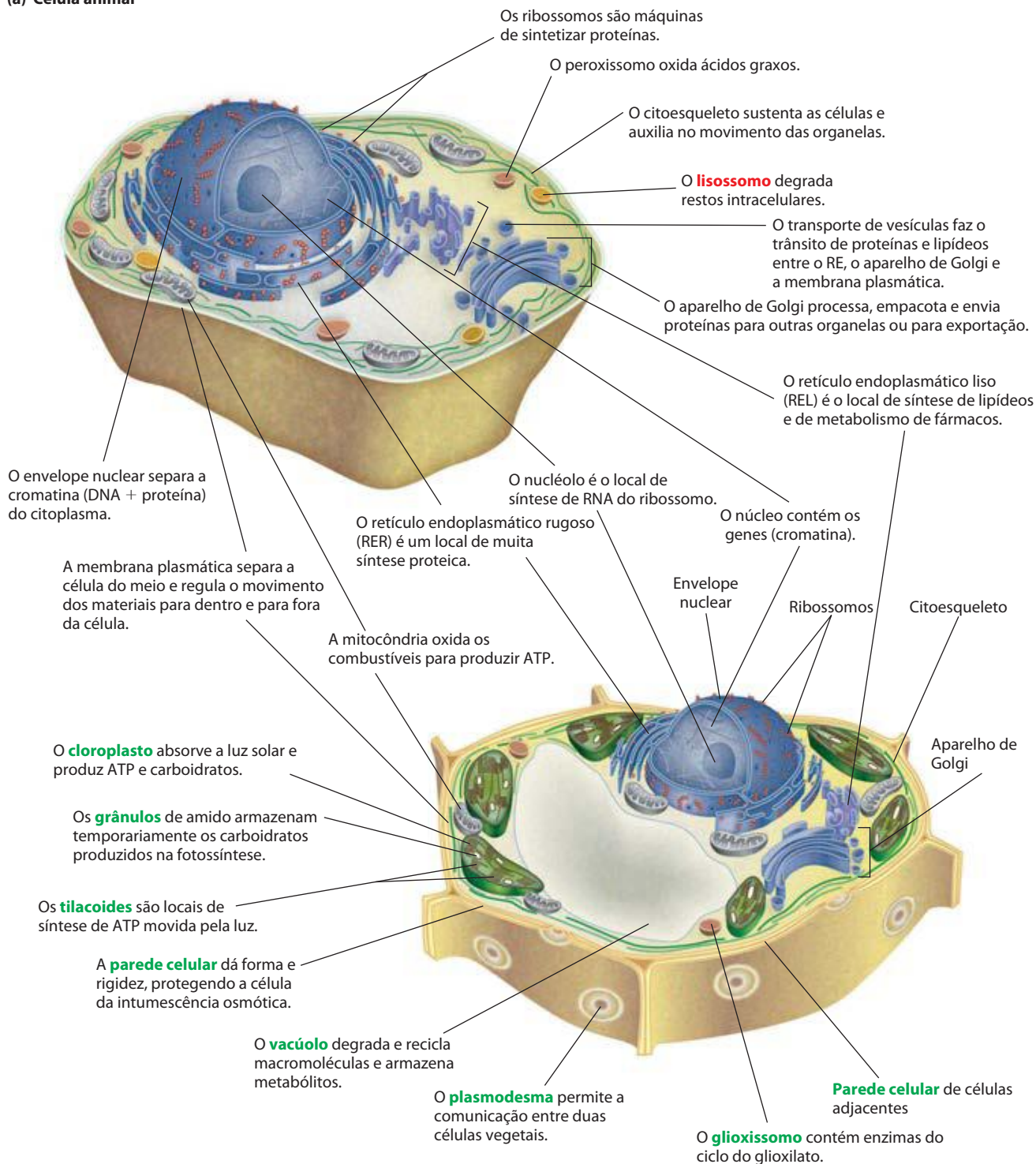



**FIGURA 1-7** **Estrutura da célula eucariótica.** Ilustrações esquemáticas dos dois principais tipos de célula eucariótica: **(a)** representação da célula animal e **(b)** representação da célula vegetal. As células vegetais geralmente têm diâmetro de 10 a 100 $\mu$m – maiores do que as células animais, que variam entre 5 e 30 $\mu$m. As estruturas marcadas em vermelho são exclusivas das células animais; as marcadas em verde são exclusivas das células vegetais. Os microrganismos eucarióticos (como protistas e fungos) têm estruturas semelhantes às das células animais e vegetais, mas muitos também têm organelas especializadas, não ilustradas aqui.

as células vegetais também têm **vacúolos** (que acumulam grandes quantidades de ácidos orgânicos) e **cloroplastos** (nos quais a luz solar realiza a síntese de ATP no processo da fotossíntese) (Figura 1-7). No citoplasma de muitas células estão presentes também grânulos ou gotículas contendo nutrientes armazenados, como amido e gordura.

Em um avanço importante na bioquímica, Albert Claude, Christian de Duve e George Palade desenvolveram métodos para separar as organelas do citosol e elas entre si – etapa essencial na investigação de suas estruturas e funções. Em um processo típico de fracionamento (**Figura 1-8**), as células ou tecidos em solução são suavemente rompidos por cisalhamento físico. Esse tratamento rompe a membrana plasmática, mas deixa intacta a maioria das organelas. O homogeneizado é então centrifugado; organelas como núcleo, mitocôndria e lisossomos diferem em tamanho e por isso sedimentam em velocidades diferentes.

Esses métodos foram utilizados para estabelecer, por exemplo, que os lisossomos contêm enzimas degradativas, as mitocôndrias contêm enzimas oxidativas, e os cloroplastos contêm pigmentos fotossintéticos. O isolamento de uma organela rica em determinada enzima é, com frequência, a primeira etapa de purificação dessa enzima.

**FIGURA 1-8 Fracionamento subcelular de tecidos.** Um tecido como o hepático é homogeneizado mecanicamente para romper as células e dispersar seu conteúdo em um tampão aquoso. O meio com sacarose tem uma pressão osmótica semelhante à das organelas, equilibrando assim a difusão da água para dentro e para fora das organelas, as quais intumesceriam e explodiriam em uma solução de osmolaridade mais baixa (ver Figura 2-13). As partículas grandes e pequenas em suspensão podem ser separadas por centrifugação em diferentes velocidades. As partículas maiores sedimentam com mais rapidez do que as partículas pequenas, e o material solúvel não se sedimenta. Pela escolha cuidadosa das condições de centrifugação, as frações subcelulares podem ser separadas por caracterização bioquímica.

## O citoplasma é organizado pelo citoesqueleto e é altamente dinâmico

A microscopia de fluorescência revela vários tipos de filamentos proteicos atravessando a célula eucariótica em várias direções, formando uma rede tridimensional interligada, o **citoesqueleto**. Existem três tipos gerais de filamentos citoplasmáticos – filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários (**Figura 1-9**) – que diferem em largura (de 6 a 22 nm), composição e função específica. Todos os tipos conferem estrutura e organização ao citoplasma e forma à célula. Os filamentos de actina e os microtúbulos também auxiliam na movimentação das organelas e da célula inteira.

Cada tipo de componente do citoesqueleto é composto por subunidades proteicas simples que se associam de forma não covalente para formar filamentos de espessura uniforme. Esses filamentos não são estruturas permanentes, sendo submetidos à constante desmontagem em suas subunidades e remontagem novamente em filamentos. Sua localização na célula não é rigidamente fixa, podendo mudar drasticamente com a mitose, a citocinese, o movimento ameboide ou mudanças na forma celular. A montagem, a desmontagem e a localização de todos os tipos de filamentos são reguladas por outras proteínas, as quais servem para ligar ou reunir os filamentos ou para mover as organelas citoplasmáticas ao longo deles. (Bactérias contêm proteínas tipo actina que servem a funções semelhantes àquelas das células.)

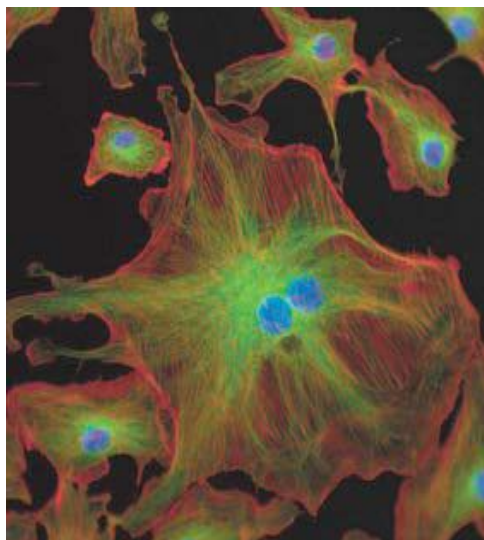
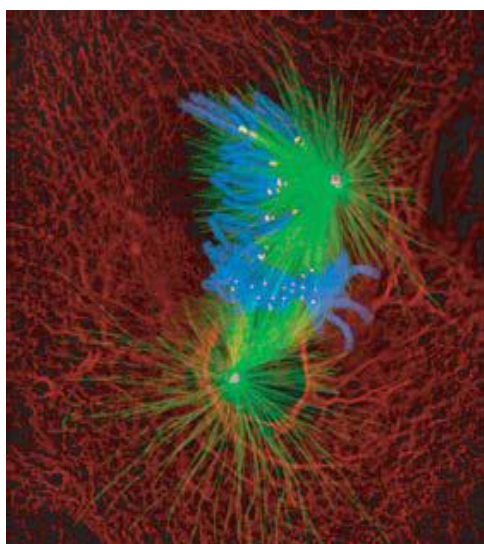
O quadro que emerge dessa breve vistoria da estrutura da célula eucariótica é o de uma célula com uma trama de fibras estruturais e um sistema complexo de compartimentos envoltos por membranas (Figura 1-7). Os filamentos se desmontam e se remontam em outro lugar. As vesículas providas de membrana brotam de uma organela e se fundem com outra. As organelas se movem pelo citoplasma ao longo de filamentos proteicos, e seu movimento é impulsionado por proteínas motoras dependentes de energia. O **sistema de endomembranas** segrega processos metabólicos específicos e provê superfícies sobre as quais ocorrem determinadas reações catalisadas por enzimas. A **exocitose** e a **endocitose**, mecanismos de transporte (para fora e para dentro da célula, respectivamente) que envolvem fusão e fissão de membranas, produzem vias entre o citoplasma e o meio circundante, permitindo a secreção de

(a)

(b)

**FIGURA 1-9 Os três tipos de filamentos do citoesqueleto: filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários.** As estruturas celulares podem ser marcadas com um anticorpo (que reconheça determinada proteína) covalentemente ligado a um composto fluorescente. As estruturas marcadas são visíveis quando a célula é observada sob um microscópio de fluorescência. **(a)** Células endoteliais da artéria pulmonar bovina. Feixes de filamentos de actina denominados "fibras de estresse" estão marcados em vermelho; os microtúbulos, irradiando a partir do centro da célula, estão marcados em verde; e os cromossomos (no núcleo) estão marcados em azul. **(b)** Célula de pulmão de salamandra em mitose. Os microtúbulos (verde) ligados a estruturas chamadas de cinetócoros (amarelo) sobre os cromossomos condensados (azul) puxam os cromossomos para polos opostos, ou centrossomos (magenta), da célula. Os filamentos intermediários, formados de queratina (vermelho), mantêm a estrutura da célula.

substâncias produzidas na célula e a captação de materiais extracelulares.

Essa organização do citoplasma, embora complexa, está longe de ser aleatória. O movimento e o posicionamento das organelas e dos elementos do citoesqueleto estão sob firme regulação. Em determinados estágios da vida a célula eucariótica é submetida a reorganizações drásticas, conduzidas com exatidão, como nos eventos da mitose. As interações entre o citoesqueleto e as organelas são não covalentes, são reversíveis e sujeitas à regulação em resposta a vários sinais intra e extracelulares.

## As células constroem estruturas supramoleculares

As macromoléculas e suas subunidades monoméricas diferem muito em tamanho (**Figura 1-10**). Uma molécula de alanina tem menos de 0,5 nm de comprimento. Uma molécula de hemoglobina, a proteína transportadora de oxigênio dos eritrócitos (células vermelhas do sangue), consiste em subunidades contendo cerca de 600 resíduos de aminoácidos em quatro longas cadeias, dobradas em forma globular e associadas em uma estrutura de 5,5 nm de diâmetro. As proteínas, por sua vez, são muito menores do que os ribossomos (cerca de 20 nm de diâmetro), os quais, por sua vez, são menores do que organelas como as mitocôndrias, que têm 1.000 nm de diâmetro. É um grande salto das biomoléculas simples às estruturas celulares que podem ser vistas ao microscópio óptico. A **Figura 1-11** ilustra a hierarquia estrutural na organização celular.

As subunidades monoméricas das proteínas, dos ácidos nucleicos e dos polissacarídeos são unidas por ligações covalentes. Nos complexos supramoleculares, contudo, as macromoléculas são unidas por interações não covalentes – individualmente muito mais fracas do que as covalentes. Entre essas interações, estão as ligações de hidrogênio (entre grupos polares), as interações iônicas (entre grupos carregados), as interações hidrofóbicas (entre grupos apolares em solução aquosa) e as interações de van der Waals (forças de London) – todas elas com energia muito menor do que as ligações covalentes. Essas interações são descritas no Capítulo 2. O grande número de interações fracas entre as macromoléculas em complexos supramoleculares estabilizam essas agregações, gerando suas estruturas características.

## Estudos *in vitro* podem omitir interações importantes entre moléculas

Uma abordagem para o entendimento de um processo biológico é o estudo *in vitro* de moléculas purificadas ("no vidro" – no tubo de ensaio), sem a interferência de outras moléculas presentes na célula intacta – isto é, *in vivo* ("no vivo"). Embora essa abordagem seja muito esclarecedora, deve-se considerar que o interior de uma célula é totalmente diferente do interior de um tubo de ensaio. Os componentes "interferentes" eliminados na purificação podem ser cruciais para a função biológica ou para a regulação da molécula purificada. Por exemplo, estudos *in vitro* de enzimas puras são comumente realizados com concentrações muito baixas da enzima em soluções aquosas sob agitação. Na célula, uma enzima está dissolvida ou suspensa no citosol com consistência gelatinosa junto com milhares de outras proteínas, e algumas delas se ligam à enzima e influenciam sua atividade. Algumas enzimas são componentes de complexos multienzimáticos nos quais os reagentes passam de uma enzima para a outra, sem interagir com o solvente. Quando todas as macromoléculas conhe-

cidas de uma célula são representadas em suas dimensões e concentrações conhecidas (**Figura 1-12**), fica claro que o citosol é bem ocupado e que a difusão de macromoléculas dentro do citosol deve ser mais lenta devido à colisão com outras estruturas grandes. Em resumo, certa molécula pode ter um comportamento muito diferente na célula e *in vitro*. Um desafio central na bioquímica é entender as influências da organização celular e das associações macromoleculares sobre a função das enzimas individuais e outras biomoléculas – para entender a função *in vivo* assim como *in vitro*.

## RESUMO 1.1 Fundamentos celulares

- Todas as células são delimitadas por uma membrana plasmática; têm um citosol contendo metabólitos, coenzimas, íons inorgânicos e enzimas; e têm um conjunto de genes contidos dentro de um nucleoide (bactérias e arqueias) ou de um núcleo (eucariotos).
- Todos os organismos requerem uma fonte de energia para realizar o trabalho celular. Os fototróficos obtêm energia da luz solar; os quimiotróficos oxidam combustíveis químicos, transferindo elétrons para bons aceptores: compostos inorgânicos, compostos orgânicos ou oxigênio molecular.
- As células de bactérias e de arqueias contêm citosol, nucleoide e plasmídeos, todos contidos dentro de um envelope celular. As células eucarióticas têm núcleo e são

**(a) Alguns dos aminoácidos das proteínas**

Alanina

Serina

Aspartato

Tirosina

Histidina

Cisteína

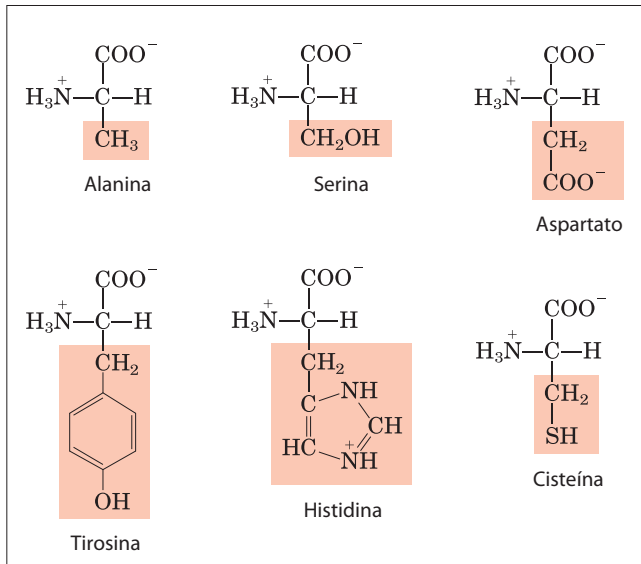



**FIGURA 1-10 Os compostos orgânicos a partir dos quais é formada a maior parte dos materiais celulares: o ABC da bioquímica.** Estão mostrados aqui **(a)** seis dos 20 aminoácidos que formam todas as proteínas (as cadeias laterais estão sombreadas em vermelho); **(b)** as cinco bases nitrogenadas, os dois açúcares de cinco carbonos e os íons fosfato que formam os ácidos nucleicos; **(c)** os cinco componentes dos lipídeos de membrana; e **(d)** D-glicose, o açúcar simples que forma a maioria dos carboidratos. Observe que o fosfato é um componente dos ácidos nucleicos e dos lipídeos de membrana.

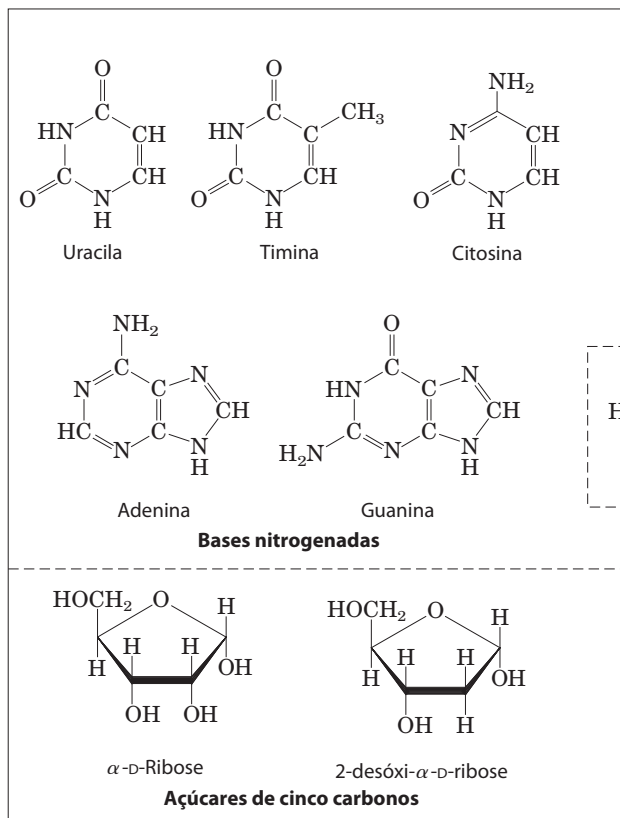
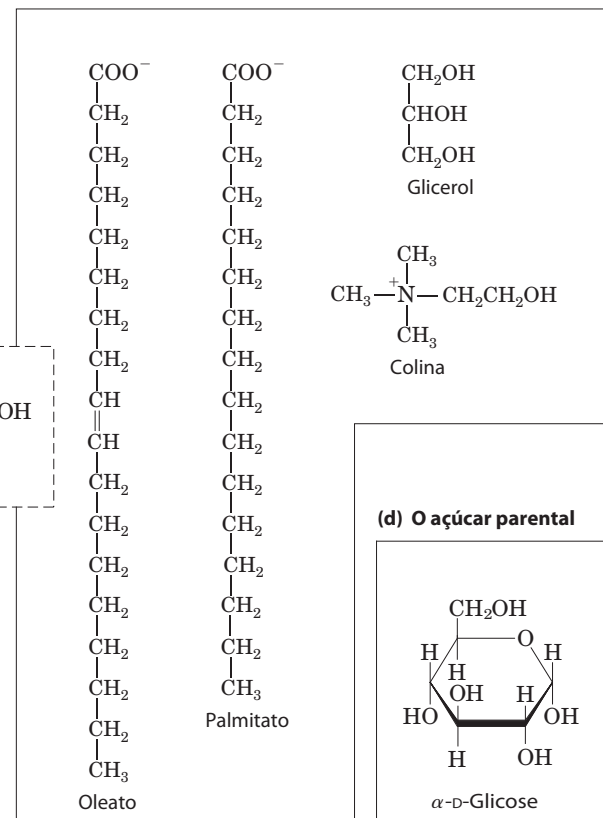
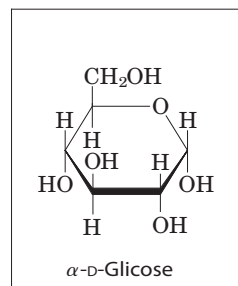
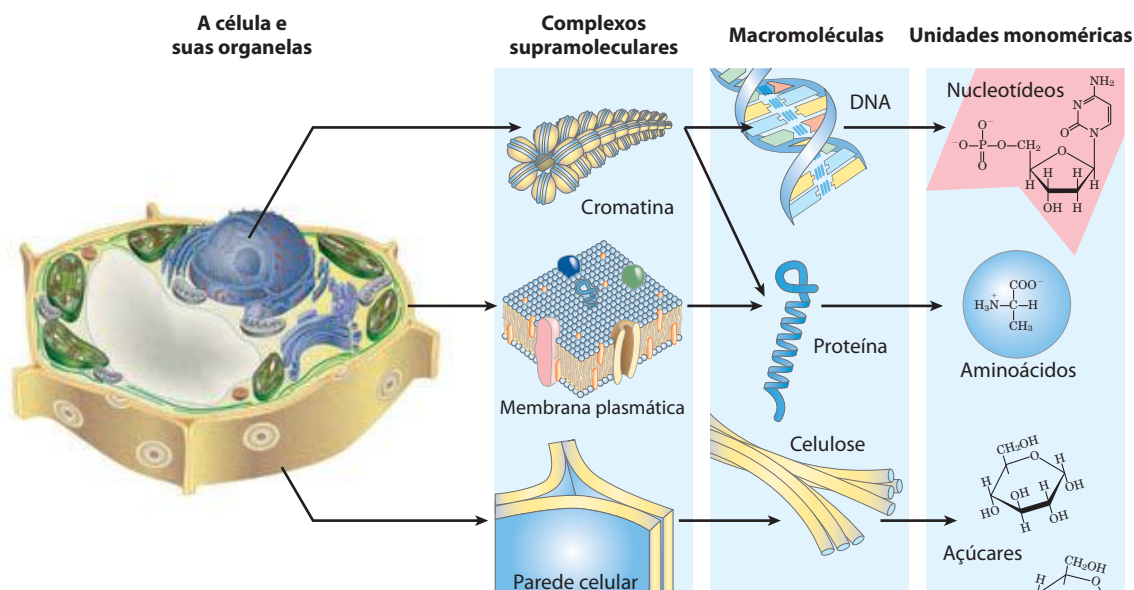



**FIGURA 1-11 Hierarquia estrutural na organização molecular das células.** As organelas e outras estruturas relativamente grandes das células são feitas de complexos supramoleculares, que por sua vez são feitos de moléculas menores e de subunidades moleculares menores. Por exemplo, o núcleo desta célula de planta contém cromatina, complexo supramolecular que consiste em DNA e proteínas (histonas). O DNA é feito de subunidades monoméricas simples (nucleotídeos), assim como as proteínas (aminoácidos).

multicompartimentalizadas, com determinados processos segregados em organelas específicas; as organelas podem ser separadas e estudadas isoladamente.

- As proteínas do citoesqueleto se organizam em longos filamentos que dão forma e rigidez às células e servem como trilhos ao longo dos quais as organelas celulares se deslocam por toda a célula.

**FIGURA 1-12 A célula lotada.** Este desenho de David Goodsell é uma representação precisa dos tamanhos relativos e número de macromoléculas em uma região pequena da célula de *E. coli*. Este citosol concentrado, repleto de proteínas e ácidos nucleicos, é muito diferente de um extrato típico de células em estudos bioquímicos onde o citosol é diluído muitas vezes, alterando bastante a interação entre as macromoléculas.

- Complexos supramoleculares unidos por interações não covalentes são parte de uma hierarquia de estruturas, algumas delas visíveis ao microscópio óptico. Quando moléculas individuais são removidas desses complexos para serem estudadas *in vitro*, algumas interações, importantes na célula viva, podem ser perdidas.

## 1.2 Fundamentos químicos

A bioquímica tenta explicar as formas e as funções biológicas em termos químicos. No final do século XVIII, os químicos concluíram que a composição da matéria viva é impressionantemente diferente daquela do mundo inanimado. Antoine-Laurent Lavoisier (1743-1794) percebeu a relativa simplicidade do "mundo mineral" e contrastou-a com a complexidade dos "mundos animal e vegetal". Ele sabia que esses últimos eram constituídos de compostos ricos nos elementos carbono, oxigênio, nitrogênio e fósforo.

Durante a primeira metade do século XX, investigações bioquímicas conduzidas em paralelo sobre a oxidação da glicose em leveduras e células de músculo animal revelaram semelhanças químicas marcantes nesses dois tipos celulares aparentemente muito distintos, indicando que a queima da glicose em leveduras e células musculares envolve os mesmos 10 intermediários químicos e as mesmas 10 enzimas. Estudos subsequentes de muitos outros processos químicos em diferentes organismos confirmaram a generalidade dessa observação, resumida em 1954 por Jacques Monod: "O que vale para a *E. coli* também vale para um elefante". A atual compreensão de que todos os organismos têm uma origem evolutiva comum baseia-se, em parte, nessa observação de que todos compartilhem dos mesmos processos e intermediários químicos, o que muitas vezes é denominado de unidade bioquímica.

**FIGURA 1-13 Elementos essenciais para a vida e a saúde dos animais.** Os elementos principais (vermelho) são componentes estruturais das células e dos tecidos e são necessários na dieta em uma quantidade de vários gramas por dia. Para os elementos-traço (amarelo), as quantidades requeridas são muito menores: para humanos, alguns miligramas por dia de Fe, Cu e Zn são suficientes, e quantidades ainda menores dos demais elementos. As necessidades mínimas para plantas e microrganismos são semelhantes às mostradas aqui; o que varia são as maneiras pelas quais eles adquirem esses elementos.

Menos de 30 entre os mais de 90 elementos químicos de ocorrência natural são essenciais para os organismos. A maioria dos elementos da matéria viva tem um número atômico relativamente baixo; somente três têm números atômicos maiores do que o selênio, 34 (**Figura 1-13**). Os quatro elementos químicos mais abundantes nos organismos vivos, em termos de porcentagem do total de número de átomos, são hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e carbono, que juntos constituem mais de 99% da massa das células. Eles são os elementos mais leves capazes de formar de maneira eficiente uma, duas, três e quatro ligações; em geral, os elementos mais leves formam ligações mais fortes. Os elementos-traço (Figura 1-13) representam uma fração minúscula do peso do corpo humano, mas todos são essenciais à vida, geralmente por serem essenciais para a função de proteínas específicas, incluindo muitas enzimas. A capacidade de transporte de oxigênio da hemoglobina, por exemplo, é totalmente dependente de quatro íons ferro, que somados representam somente 0,3% da massa total.

## Biomoléculas são compostos de carbono com uma grande variedade de grupos funcionais

A química dos organismos vivos está organizada em torno do carbono, que contribui com mais da metade do peso seco das células. O carbono pode formar ligações simples com átomos de hidrogênio, assim como ligações simples e duplas com átomos de oxigênio e nitrogênio (**Figura 1-14**). A capacidade dos átomos de carbono de formar ligações simples estáveis com até quatro outros átomos de carbono é de grande importância na biologia. Dois átomos de carbono também podem compartilhar dois (ou três) pares de elétrons, formando assim ligações duplas (ou triplas).

As quatro ligações simples que podem ser formadas pelo átomo de carbono se projetam a partir do núcleo formando os quatro vértices de um tetraedro (**Figura 1-15**), com ângulo de aproximadamente 109,5° entre duas ligações quaisquer e comprimento médio de ligação de 0,154 nm. A rotação é livre em torno de cada ligação simples, a menos que grupos muito grandes ou altamente carregados estejam ligados aos átomos de carbono. Nesse caso, a rotação pode ser limitada. Já a ligação dupla é mais curta (cerca de 0,134 nm) e rígida, permitindo somente uma rotação limitada em torno do seu eixo.

Átomos de carbono covalentemente ligados em biomoléculas podem formar cadeias lineares, ramificadas e estruturas cíclicas. Aparentemente, a versatilidade de ligação do carbono com outro carbono e com outros elementos foi o principal fator na seleção dos compostos de carbono para a maquinaria molecular das células durante a origem e a evolução dos organismos vivos. Nenhum outro elemento químico consegue formar moléculas com tanta diversidade de tamanhos, formas e composição.

A maioria das biomoléculas deriva dos hidrocarbonetos, tendo átomos de hidrogênio substituídos por uma grande variedade de grupos funcionais que conferem propriedades químicas específicas à molécula, formando diversas famílias de compostos orgânicos. Exemplos típicos dessas biomoléculas são os álcoois, que têm um ou mais grupos hidroxila; aminas, com grupos amina; aldeídos e cetonas, com grupos carbonila; e ácidos carboxílicos, com grupos carboxila (**Figura 1-16**). Muitas biomoléculas são polifuncionais,

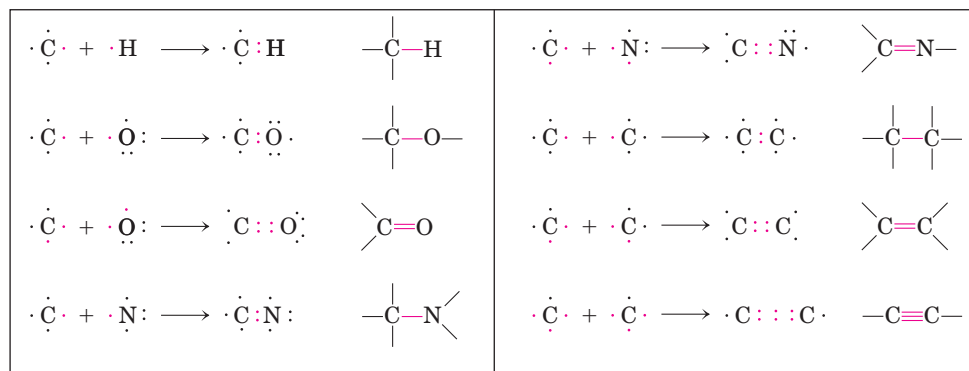



**FIGURA 1-14 A versatilidade do carbono em formar ligações.** O carbono pode formar ligações covalentes simples, duplas e triplas (indicadas em vermelho), particularmente com outros átomos de carbono. Ligações triplas são raras em biomoléculas.

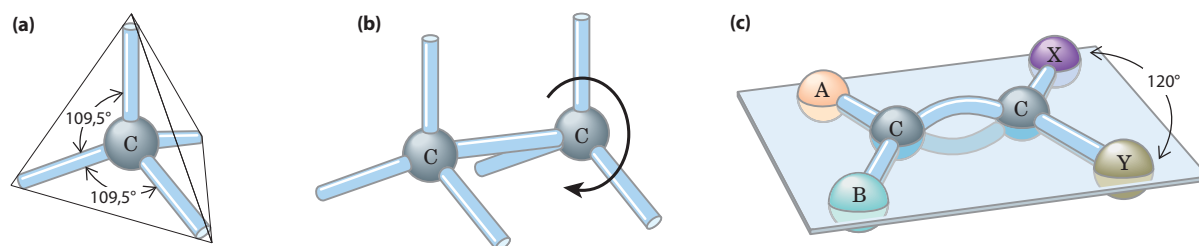



**FIGURA 1-15 Geometria da ligação do carbono.** **(a)** Os átomos de carbono têm um arranjo tetraédrico bem característico para suas quatro ligações simples. **(b)** A ligação simples carbono-carbono tem liberdade de rotação, como mostrado para o composto etano ($CH_3$—$CH_3$). **(c)** Ligações duplas são mais curtas e não permitem rotação. Os dois carbonos ligados por ligação dupla e os átomos designados por A, B, X e Y estão todos no mesmo plano rígido.

| Grupo | Estrutura | Grupo | Estrutura | Grupo | Estrutura |
|---|---|---|---|---|---|
| Metila | R—C—H | Éter | R¹—O—R² | Guanidina | R—N—C—N |
| Etila | R—C—C—H | Éster | R¹—C—O—R² | Imidazol | R—C=CH |
| Fenila | R—C ... CH | Acetila | R—O—C—C—H | Sulfidrila | R—S—H |
| Carbonila (aldeído) | R—C—H | Anidrido (dois ácidos carboxílicos) | R¹—C—O—C—R² | Dissulfeto | R¹—S—S—R² |
| Carbonila (cetona) | R¹—C—R² | Amino (protonado) | R—N⁺—H | Tioéster | R¹—C—S—R² |
| Carboxila | R—C—O⁻ | Amida | R—C—N | Fosforila | R—O—P—OH |
| Hidroxila (álcool) | R—O—H | Imina | R¹—C—R² | Fosfoanidrido | R¹—O—P—O—P—O—R² |
| Enol | R—C=C | Imina *N*-substituída (base de Schiff) | R¹—C—R² | Anidrido misto (de ácido carboxílico e ácido fosfórico; também chamado de acil-fosfato) | R—C—O—P—OH |

**FIGURA 1-16 Alguns grupos funcionais comuns em biomoléculas.** Os grupos funcionais estão pintados com uma cor usada para o elemento que caracteriza aquele grupo: cinza para C, cor salmão para O, azul para N, amarelo para S e cor de laranja para P. Nesta figura e em todo o livro, será usado R para representar "qualquer substituinte". Ele pode ser tão simples como um átomo de hidrogênio, mas geralmente será um grupo contendo carbono. Quando dois ou mais substituintes são mostrados em uma molécula, serão designados como $R^1$, $R^2$ e assim por diante.

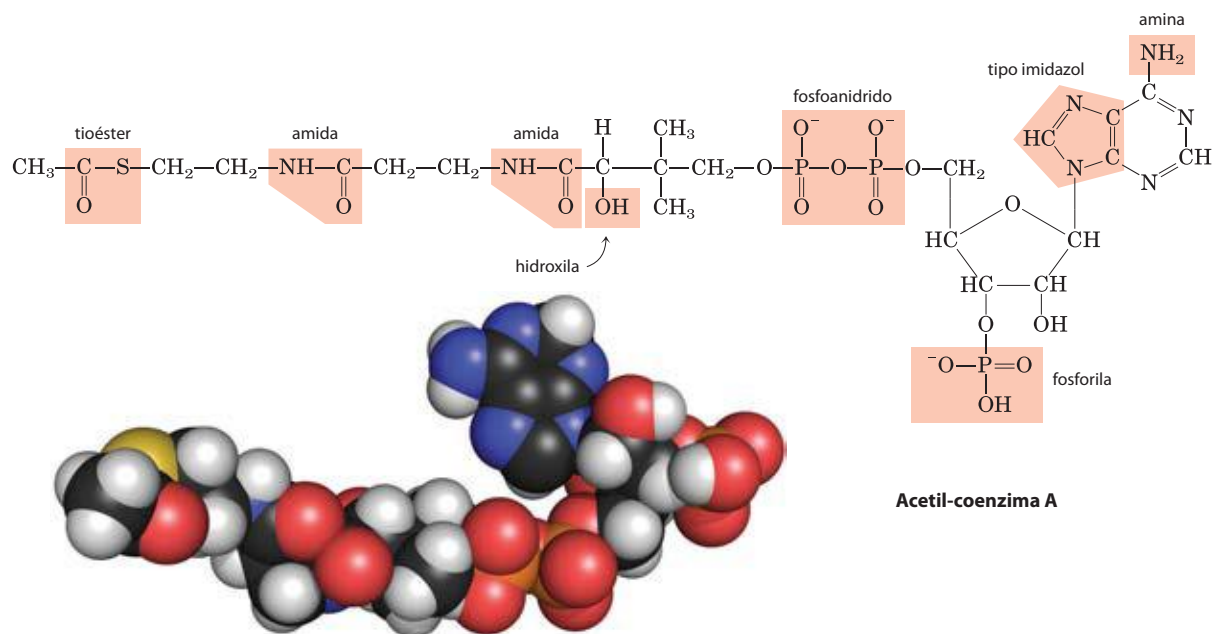
tioéster amida amida hidroxila fosfoanidrido tipo imidazol amina fosforila

**Acetil-coenzima A**

**FIGURA 1-17 Vários grupos funcionais comuns em uma única biomolécula.** Acetil-coenzima A (frequentemente abreviada como acetil--CoA) é uma carreadora de grupos acetila em algumas reações enzimáticas. Os grupos funcionais são mostrados na fórmula estrutural. Como será visto no Capítulo 2, alguns desses grupos funcionais podem existir nas formas protonadas ou não protonadas, dependendo do pH. No modelo de volume atômico, N é azul, C é preto, P é cor de laranja, O é cor salmão e H é branco. O átomo amarelo no lado esquerdo é o enxofre da ligação tioéster, importante na mediação entre a parte acetila e coenzima A.

contendo dois ou mais tipos de grupos funcionais (**Figura 1-17**), cada qual com suas características químicas e de reação. A "personalidade" química de um composto é determinada pela química de seu grupo funcional e pela sua disposição no espaço tridimensional.

## As células contêm um conjunto universal de moléculas pequenas

Existe uma coleção de aproximadamente mil moléculas orgânicas pequenas ($M_r$ ~100 a ~500) diferentes dissolvidas na fase aquosa (citosol) das células, com concentração intracelular na faixa de nanomolar a milimolar (ver Figura 15-4). (Consultar no Quadro 1-1 a explicação sobre as várias maneiras de se referir às massas moleculares.) Esses são os metabólitos centrais das principais rotas metabólicas que ocorrem em quase todas as células – isto é, os metabólitos e as rotas que foram conservados durante o curso da evolução. Essa coleção de moléculas inclui os aminoácidos comuns, nucleotídeos, açúcares e seus derivados fosforilados e ácidos mono, di e tricarboxílicos. As moléculas podem ser polares ou carregadas, e são solúveis em água. Elas estão aprisionadas no interior das células porque a membrana plasmática é impermeável a elas, embora

### QUADRO 1-1 Peso molecular, massa molecular e suas unidades corretas

Há duas maneiras comuns (e equivalentes) para descrever massa molecular, e as duas são usadas neste texto. A primeira é *peso molecular*, ou *massa molecular relativa*, denominada $M_r$. O peso molecular da substância é definido como a relação da massa da molécula da substância para um duodécimo da massa do carbono-12 ($^{12}C$). Visto que $M_r$ é uma razão, ela é adimensional – não tem unidades associadas. A segunda é a *massa molecular*, denotada por $m$, simplesmente a massa da molécula, ou a massa molar, dividida pelo número de Avogadro. Essa massa molecular, $m$, é expressa em dáltons (abreviado Da). Um dálton é equivalente a um duodécimo da massa do carbono-12; um quilodálton (kDa) é 1.000 dáltons; um megadálton (MDa) é um milhão de dáltons.

Considere, por exemplo, uma molécula com massa 1.000 vezes superior à da água. Pode-se dizer que essa molécula tem $M_r$ = 18.000 ou $m$ = 18.000 dáltons. Pode-se também descrevê-la como "molécula com 18 kDa". Entretanto, a expressão $M_r$ = 18.000 dáltons é incorreta. Outra unidade conveniente para descrever a massa de um único átomo ou molécula é a unidade de massa atômica (antes denominada u.m.a., agora geralmente descrita como u). Uma unidade de massa atômica (1 u) é definida como um duodécimo da massa do átomo do carbono-12. Experimentalmente, a medida da massa de um átomo de carbono-12 é $1{,}9926 \times 10^{-23}$ g, então 1 u = $1{,}6606 \times 10^{-24}$ g. A unidade de massa atômica é conveniente para descrever a massa dos picos observados em espectrometria de massas (ver Capítulo 3, página 100).

transportadores de membrana específicos possam catalisar o deslocamento de algumas moléculas para dentro e para fora da célula ou entre compartimentos nas células eucarióticas. A ocorrência universal dos mesmos conjuntos de compostos nas células vivas reflete a conservação evolutiva das rotas metabólicas que se desenvolveram nas células primitivas.

Existem outras biomoléculas pequenas específicas de certos tipos de células ou organismos. Por exemplo, plantas vasculares contêm, além do conjunto universal, moléculas pequenas chamadas de **metabólitos secundários**, que exercem funções específicas para a vida da planta. Esses metabólitos incluem compostos que dão às plantas seus aromas e cores característicos, e compostos como morfina, quinino, nicotina e cafeína que são apreciados pelos seus efeitos fisiológicos em humanos, mas usados para outros propósitos pelas plantas.

O conjunto completo de moléculas pequenas em uma dada célula sob um conjunto específico de condições tem sido chamado de **metaboloma**, em analogia ao termo "genoma". **Metabolômica** é a caracterização sistemática do metaboloma sob condições bem específicas (como após a administração de um fármaco ou de um sinal biológico como insulina).

## As macromoléculas são os principais constituintes das células

Muitas moléculas biológicas são **macromoléculas**, polímeros com peso molecular acima de ~5.000 montados a partir de precursores relativamente simples. Polímeros mais curtos são chamados de **oligômeros** (do grego *oligos*, "poucos"). Proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos são macromoléculas feitas de monômeros cujos pesos moleculares são 500 ou menos. A síntese de macromoléculas é a atividade que mais consome energia nas células. As macromoléculas podem ainda sofrer processamentos adicionais que resultam em complexos supramoleculares, formando unidades funcionais como os ribossomos. A Tabela 1-1 mostra as principais classes de biomoléculas em uma célula de *E. coli.*

**TABELA 1-1** Componentes moleculares de uma célula de *E. coli*

| | Porcentagem do peso total de célula | Número aproximado de espécies moleculares diferentes |
|---|---|---|
| Água | 70 | 1 |
| Proteínas | 15 | 3.000 |
| Ácidos nucleicos | | |
| DNA | 1 | 1-4 |
| RNA | 6 | > 3.000 |
| Polissacarídeos | 3 | 10 |
| Lipídeos | 2 | 20 |
| Subunidades monoméricas e intermediárias | 2 | 500 |
| Íons inorgânicos | 1 | 20 |

As **proteínas**, que são polímeros longos de aminoácidos, constituem a maior fração (além da água) da célula. Algumas proteínas têm atividade catalítica e funcionam como enzimas; outras servem como elementos estruturais, receptores de sinal, ou transportadores que carregam substâncias específicas para dentro ou para fora das células. As proteínas são, talvez, as mais versáteis de todas as biomoléculas; um catálogo de suas mais variadas funções seria bem extenso. O conjunto de todas as proteínas em funcionamento em determinada célula é chamado de **proteoma** da célula, e **proteômica** é a caracterização sistemática dessa guarnição total de proteínas observadas em um conjunto específico de condições. Os **ácidos nucleicos**, DNA e RNA, são polímeros de nucleotídeos. Eles armazenam e transmitem a informação genética, e algumas moléculas de RNA apresentam também função estrutural e catalítica em complexos supramoleculares. O **genoma** é a sequência completa do DNA da célula (ou no caso do RNA viral, o seu RNA), e **genômica** é a caracterização da estrutura comparativa, função, evolução e mapeamento dos genomas. Os **polissacarídeos**, polímeros de açúcares simples como a glicose, apresentam três funções principais: depósitos de combustível de alto conteúdo energético, componentes estruturais rígidos da parede celular (em plantas e bactérias) e elementos no reconhecimento extracelular que se ligam a proteínas de outras células. Polímeros mais curtos de açúcares (oligossacarídeos) ligados a proteínas ou lipídeos na superfície da célula servem como sinais celulares específicos. O **glicoma** da célula é o conjunto de todas as moléculas contendo carboidratos. Os **lipídeos**, derivados de hidrocarbonetos e insolúveis em água, servem como componentes estruturais das membranas, depósitos de combustível de alto conteúdo energético, pigmentos e sinais intracelulares. O conjunto de todas as moléculas contendo lipídeos em uma célula constitui o seu **lipidoma**. Com a aplicação de métodos sensíveis e elevado poder de resolução (p. ex., espectrometria de massas), é possível distinguir e quantificar centenas e milhares desses componentes e, portanto, quantificar as suas variações em resposta às alterações das condições, sinais ou drogas. A biologia de sistemas é uma abordagem que tenta integrar a informação da genômica, proteômica, glicômica e lipidômica para fornecer uma descrição molecular de todas as atividades da célula sob um conjunto de condições, e as mudanças que ocorrem quando o sistema é perturbado por sinais externos, por certas situações ou por mutações.

Proteínas, polinucleotídeos e polissacarídeos apresentam um grande número de subunidades monoméricas e, como consequência, alto peso molecular – na faixa de 5.000 até mais de 1 milhão para proteínas, até vários *bilhões* para ácidos nucleicos e milhões para polissacarídeos como o amido. Moléculas de lipídeos individuais são muito menores ($M_r$ entre 750 e 1.500) e não são classificadas como macromoléculas, mas podem associar-se não covalentemente formando estruturas muito grandes. Membranas celulares são formadas por grandes agregados não covalentes de moléculas de lipídeos e proteínas.

Dadas as sequências características de suas subunidades, ricas em informação, as proteínas e os ácidos nucleicos são muitas vezes referidos como **macromoléculas informacionais**. Alguns oligossacarídeos, como observado anteriormente, também servem como moléculas informacionais.

## A estrutura tridimensional é descrita pela configuração e pela conformação

As ligações covalentes e os grupos funcionais das biomoléculas são, obviamente, essenciais para o seu funcionamento, como também é o arranjo dos constituintes atômicos das moléculas no espaço tridimensional – isto é, sua estereoquímica. Compostos contendo carbono normalmente existem como **estereoisômeros**, moléculas com as mesmas ligações químicas e mesma fórmula molecular, mas com diferentes **configurações**. Interações entre biomoléculas são invariavelmente **estereoespecíficas**, exigindo configurações específicas das moléculas interagentes.

A **Figura 1-18** mostra três maneiras de ilustrar a estereoquímica, ou configuração, das moléculas simples. O diagrama em perspectiva especifica a estereoquímica de forma inequívoca, mas o ângulo das ligações e os comprimentos das ligações centro a centro são mais bem representados pelos modelos de esfera e bastão. No modelo de volume atômico, o raio de cada "átomo" é proporcional ao seu raio de van der Waals, e os contornos do modelo definem o espaço ocupado pela molécula (o volume do espaço no qual os átomos das outras moléculas estão excluídos).

A configuração é conferida pela presença de (1) ligações duplas, em torno das quais existe pouca ou nenhuma liberdade de rotação, ou (2) pela presença de centros quirais, em torno dos quais grupos substituintes são arranjados em uma orientação específica. A característica que permite identificar estereoisômeros é o fato de não poderem ser interconvertidos sem quebrar temporariamente uma ou mais ligações covalentes. A **Figura 1-19a** mostra a configuração do ácido maleico e seu isômero, ácido fumárico. Esses compostos são **isômeros geométricos**, ou **isômeros *cis-trans***, que diferem no arranjo de seus grupos substituintes com respeito à ligação dupla rígida (não rotativa) (do latim *cis*, "neste lado" – grupos com ligações duplas do mesmo lado; *trans*, "através de" – grupos em lados opostos). O ácido ma-

**FIGURA 1-18 Representações das moléculas.** Três maneiras de representar a estrutura do aminoácido alanina (mostrado na forma iônica encontrada em pH neutro). **(a)** Fórmula estrutural em perspectiva: uma cunha sólida (▬) representa uma ligação na qual o átomo se projeta para fora do plano do papel, na direção do leitor; a cunha tracejada (┅) representa a ligação estendida para trás do plano do papel. **(b)** Modelo de esfera e bastão, mostrando os comprimentos relativos das ligações e os ângulos das ligações. **(c)** Modelo de volume atômico, no qual cada átomo é mostrado com seu raio de van der Waals relativo correto.

**FIGURA 1-19 Configuração de isômeros geométricos.** **(a)** Isômeros como o ácido maleico (maleato em pH 7) e o ácido fumárico (fumarato) não podem ser interconvertidos sem quebrar ligações covalentes, o que requer o gasto de muito mais energia do que a média da energia cinética das moléculas a temperaturas fisiológicas. **(b)** Na retina dos vertebrados, o evento inicial na detecção de luz é a absorção da luz visível pelo 11-*cis*-retinal. A energia da luz absorvida (em torno de 250 kJ/mol) converte 11-*cis*-retinal em retinal todo *trans*, provocando mudanças na célula da retina, o que desencadeia o impulso nervoso. (Note que os átomos de hidrogênio são omitidos nos modelos de esfera e bastão.)

Imagem especular da molécula original

Molécula não quiral: a molécula girada pode ser sobreposta à sua imagem especular

Molécula original

(b)

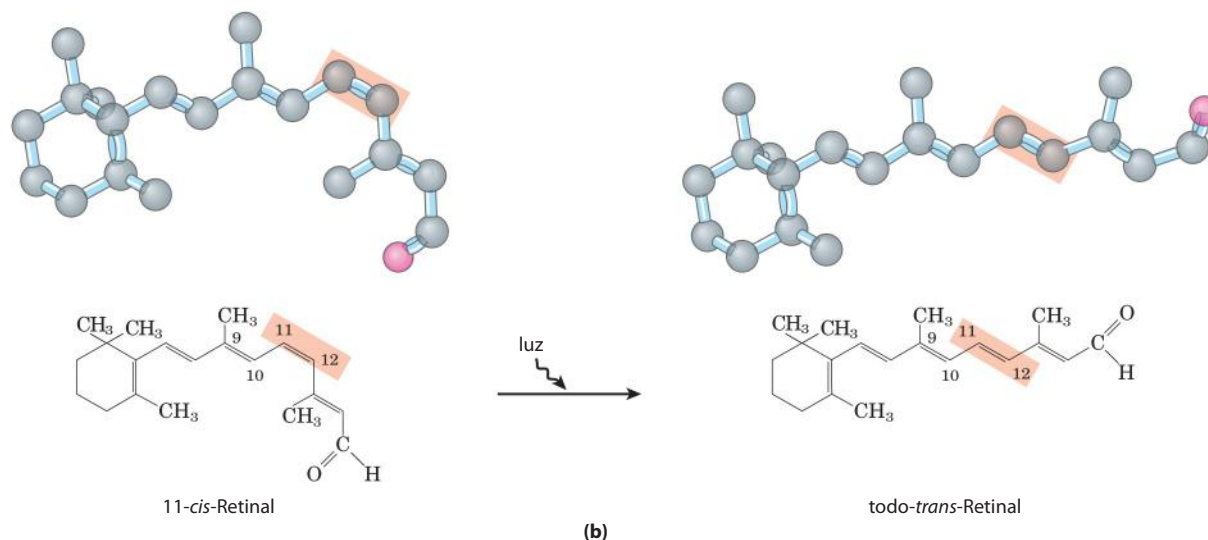
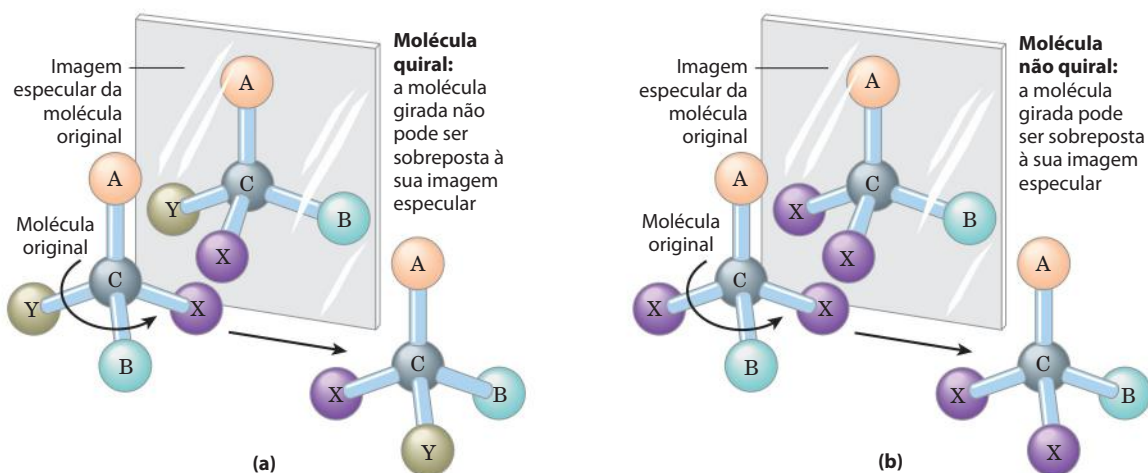



**FIGURA 1-20 Assimetria molecular: moléculas quirais e não quirais. (a)** Quando um átomo de carbono tem quatro grupos substituintes diferentes (A, B, X, Y), estes podem estar arranjados de duas maneiras, que representam imagens especulares não sobreponíveis (enantiômeros). O átomo de carbono assimétrico é chamado de átomo quiral ou centro quiral. **(b)** Quando um carbono tetraédrico tem somente três grupos diferentes (isto é, o mesmo grupo ocorre duas vezes), somente uma configuração é possível e a molécula é simétrica ou não quiral. Neste caso, a molécula tem sua imagem superposta na imagem especular: a molécula do lado esquerdo pode girar no sentido anti-horário (quando vista de cima para baixo na direção da ligação de A com C) para formar a molécula vista no espelho.

leico (maleato no pH neutro do citoplasma) é o isômero *cis*, e o ácido fumárico (fumarato), o isômero *trans*; cada um dos compostos é bem definido e eles podem ser separados um do outro, cada um possuindo propriedades químicas únicas. Um sítio de ligação (p. ex., em uma enzima) complementar a uma dessas moléculas não será complementar à outra, o que explica por que esses dois compostos têm papéis biológicos distintos apesar de sua constituição química similar.

No segundo tipo de estereoisômeros, os quatro diferentes substituintes ligados a um átomo de carbono tetraédrico podem ser arranjados em duas formas espaciais distintas – isto é, têm duas configurações (**Figura 1-20**) – produzindo dois estereoisômeros com propriedades químicas semelhantes ou idênticas, porém diferindo em certas propriedades físicas e biológicas. Um átomo de carbono com quatro substituintes diferentes é considerado assimétrico, e carbonos assimétricos são chamados de **centros quirais** (do grego *chiros*, "mão"; alguns estereoisômeros estão estruturalmente relacionados da mesma forma que a mão direita está relacionada com a esquerda). Uma molécula com somente um carbono quiral pode ter dois estereoisômeros; quando dois ou mais ($n$) carbonos quirais estão presentes, então podem existir $2^n$ estereoisômeros. Estereoisômeros que são imagens especulares um do outro são chamados de **enantiômeros** (Figura 1-20). Pares de estereoisômeros que não são imagens especulares um do outro são chamados de **diastereoisômeros** (**Figura 1-21**).

Como Louis Pasteur pela primeira vez observou em 1843 (Quadro 1-2), os enantiômeros têm reatividades químicas quase idênticas, mas diferem em uma propriedade física bem característica: sua interação com a luz polarizada. Em

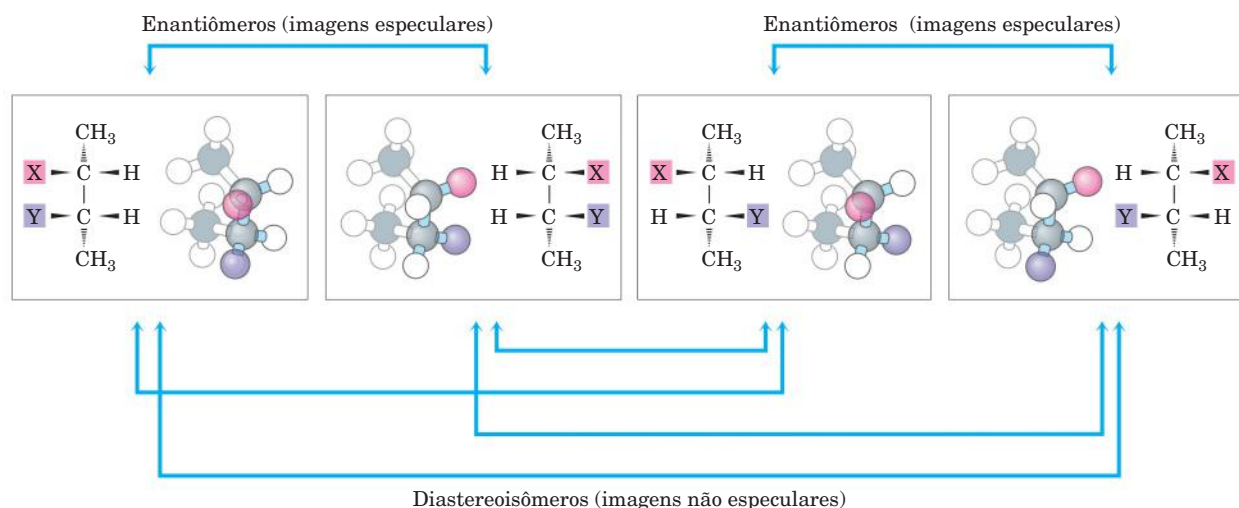



**FIGURA 1-21 Enantiômeros e diastereoisômeros.** Existem quatro diferentes estereoisômeros de 2,3-butanos dissubstituídos ($n = 2$ carbonos assimétricos, consequentemente $2^n = 4$ estereoisômeros). Cada um é mostrado em um retângulo com a fórmula em perspectiva e o modelo de esfera e bastão, que foi girado para a visualização de todos os grupos. Dois pares de estereoisômeros são imagens especulares um do outro, ou enantiômeros. Outros pares não são imagens especulares, sendo diastereoisômeros.

## QUADRO 1-2 Louis Pasteur e atividade óptica: *In Vino, Veritas*

Louis Pasteur descobriu o fenômeno da **atividade óptica** em 1843, durante sua investigação sobre os sedimentos cristalinos que se acumulavam nos barris de vinho (forma de ácido tartárico chamado de ácido paratartárico – também chamado de ácido racêmico, do latim *racemus*, "cacho de uvas"). Ele usou pinças finas para separar dois tipos de cristais idênticos em forma, mas com imagem especular um do outro. Ambos os tipos provaram ter todas as propriedades químicas do ácido tartárico, mas em solução um tipo gira a luz plano-polarizada para a esquerda (levorrotatório) e o outro para a direita (dextrorrotatório). Posteriormente, Pasteur descreveu o experimento e sua interpretação:

Louis Pasteur, 1822-1895

> Em corpos isoméricos, os elementos e as proporções nas quais eles são combinados são os mesmos, somente o arranjo dos átomos é diferente... Sabe-se, por um lado, que os arranjos moleculares dos dois ácidos tartáricos são assimétricos, e, por outro lado, que esses arranjos são absolutamente idênticos, exceto que exibem assimetria em direções opostas. Estariam os átomos do ácido dextro agrupados em forma de espiral dextrógira? Ou estariam dispostos nas arestas de um tetraedro irregular? Ou estariam dispostos em um ou outro arranjo assimétrico citado? Não se sabe.*

Agora se sabe. Estudos de cristalografia por raios X em 1951 confirmaram que as formas levorrotatória e dextrorrotatória do ácido tartárico são imagens especulares uma da outra no nível molecular e estabeleceram a configuração absoluta de cada uma (Figura Q-1). A mesma abordagem foi usada para demonstrar que, embora o aminoácido alanina tenha duas formas estereoisoméricas (designadas D e L), nas proteínas a alanina existe exclusivamente em uma forma (o isômero L; ver Capítulo 3).

(2*R*,3*R*)-Ácido tartárico (dextrorrotatório)

(2*S*,3*S*)-Ácido tartárico (levorrotatório)

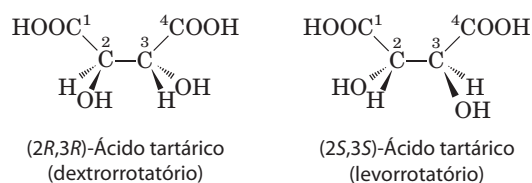
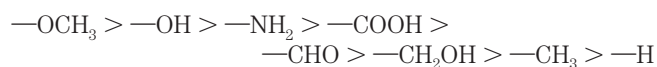
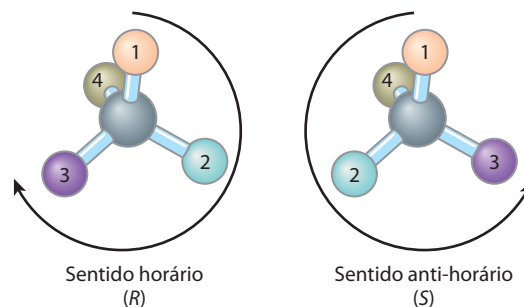



**FIGURA Q-1** Pasteur separou cristais de dois estereoisômeros de ácido tartárico e mostrou que soluções separadas de cada uma das formas fazem girar luz polarizada na mesma magnitude, porém em direções opostas. Estas formas dextrorrotatória e levorrotatória foram mais tarde demonstradas como os isômeros (*R,R*) e (*S,S*) representados aqui. O sistema RS de nomenclatura é explicado no texto.

*Da palestra de Pasteur's na Société Chimique de Paris em 1883, citado em DuBos, R. (1976) *Louis Pasteur*: *Free Lance of Science*, p. 95, Charles Scribner's Sons, New York.

soluções separadas, dois enantiômeros giram o plano da luz polarizada em direções opostas, mas uma solução contendo concentrações equimolares de cada enantiômero (**mistura racêmica**) mostra atividade óptica rotatória nula. Compostos sem centros quirais não causam a rotação do plano de polarização da luz plano-polarizada.

**CONVENÇÃO-CHAVE:** Dada a importância da estereoquímica nas reações entre biomoléculas (ver adiante), os bioquímicos são obrigados a dar nome e a representar a estrutura de cada biomolécula de forma que sua estereoquímica seja inequívoca. Para compostos com mais de um centro quiral, a nomenclatura mais usada é a do sistema RS. Nesse sistema, a cada grupo funcional ligado a um carbono quiral é designada uma escala de prioridade. As prioridades de alguns substituintes comuns são:

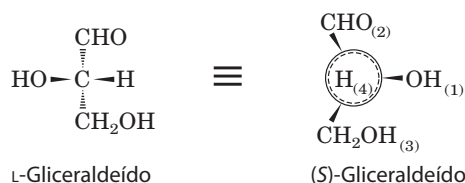
$$—OCH_3 > —OH > —NH_2 > —COOH > —CHO > —CH_2OH > —CH_3 > —H$$

Para nomeação no sistema RS, o átomo quiral é visto com o grupo de mais baixa prioridade (grupo 4 no diagrama seguinte) apontando para trás da página a partir do observador. Se a prioridade dos outros três grupos (1 a 3) decresce no sentido horário, então a configuração é (R) (do latim *rectus*, "direito"); se decresce no sentido anti-horário, então a configuração é (S) (do latim *sinister*, "esquerdo"). Dessa maneira, cada carbono quiral é designado como (R) ou (S), e a inclusão dessas designações no nome do composto fornece descrição inequívoca da estereoquímica de cada centro quiral.

Outro sistema de nomenclatura para estereoisômeros, o sistema D e L, é descrito no Capítulo 3. A molécula com um centro quiral único (dois isômeros de gliceraldeído, p. ex.) pode ser nomeada por qualquer um dos sistemas.

CHO
HO—C—H
$CH_2OH$

L-Gliceraldeído

≡

$CHO_{(2)}$
$H_{(4)}$ $OH_{(1)}$
$CH_2OH_{(3)}$

(*S*)-Gliceraldeído

Já a **conformação** molecular é diferente da configuração molecular, pois os grupos são livres para assumir diferentes posições no espaço, sem quebrar nenhuma ligação, por causa da liberdade de rotação em torno das ligações simples. Em hidrocarbonetos simples como o etano, por exemplo, há quase completa liberdade de rotação em torno da ligação C—C. Muitas conformações diferentes e interconversíveis de etano são possíveis, dependendo do grau de rotação (**Figura 1-22**). Mas duas conformações são de especial interesse: a escalonada, que é mais estável do que todas as outras e, portanto, a predominante, e a eclipsada, que é a menos estável. Essas duas formas conformacionais não podem ser isoladas uma da outra, pois são facilmente interconversíveis. Entretanto, a substituição de um ou mais átomos de hidrogênio em cada carbono por um grupo funcional que seja muito grande ou carregado eletricamente restringe a liberdade de rotação em torno da ligação C—C. Isso limita o número de conformações estáveis do derivado do etano, por exemplo.

## As interações entre as biomoléculas são estereoespecíficas

Quando biomoléculas interagem, o "encaixe" entre elas tem de ser estereoquimicamente correto. A estrutura tridimensional de biomoléculas grandes e pequenas – a combinação de configuração e conformação – é de máxima importância nas suas interações biológicas: reagente com sua enzima, hormônio com seu receptor na superfície da célula e um antígeno com seu anticorpo específico, por exemplo (**Figura 1-23**). O estudo da estereoquímica biomolecular, com métodos físicos precisos, é uma parte importante da pesquisa moderna da estrutura celular e da função bioquímica.

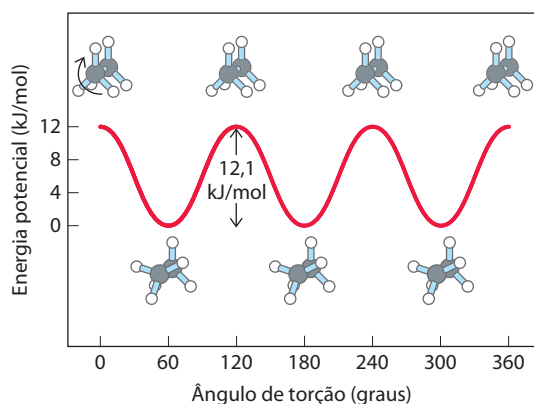



**FIGURA 1-22 Conformações.** Muitas conformações do etano são possíveis devido à liberdade de rotação em torno da ligação C—C. No modelo de esfera e bastão, quando o átomo de carbono frontal (sob o ponto de vista do leitor) é girado com seus três hidrogênios em relação ao átomo de carbono de trás, então a energia potencial da molécula aumenta ao máximo na forma completamente eclipsada (nos ângulos de 0°, 120°, etc.) e depois diminui ao mínimo na forma totalmente escalonada (ângulos de torção de 60°, 180°, etc.). Devido ao fato de as diferenças de energia serem suficientemente pequenas para permitir uma interconversão muito rápida entre as duas formas (milhões de vezes por segundo), as formas eclipsada e escalonada não podem ser isoladas uma da outra.

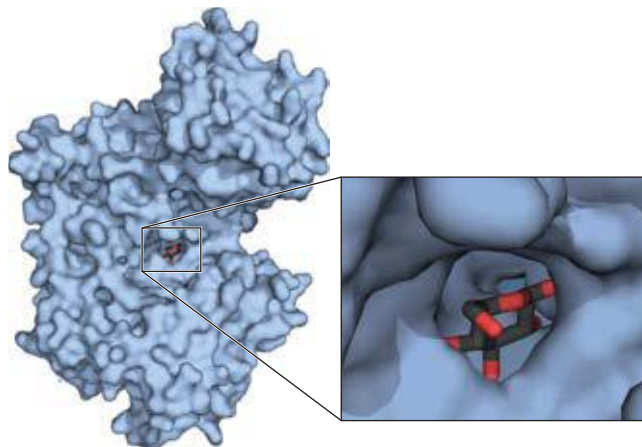



**FIGURA 1-23 Encaixe complementar entre a macromolécula e uma molécula pequena.** A molécula de glicose se encaixa em uma cavidade na superfície da enzima hexocinase (PDB ID 3B8A) e é mantida nesta orientação por várias interações não covalentes entre a proteína e o açúcar. Esta representação da molécula de hexocinase é produzida com o auxílio de um *software* que calcula a forma da superfície externa de uma macromolécula, definida pelo raio de van der Waals de todos os átomos da molécula ou pelo método do "volume de exclusão do solvente", que é o volume onde uma molécula de água não consegue penetrar.

Nos organismos vivos, as moléculas quirais normalmente estão presentes em somente uma de suas formas quirais. Por exemplo, nas proteínas os aminoácidos ocorrem somente como isômeros L e a glicose ocorre somente como isômero D. (As convenções para a denominação de estereoisômeros de aminoácidos estão descritas no Capítulo 3, e para açúcares, no Capítulo 7. O sistema RS, descrito anteriormente, é mais usado para algumas biomoléculas.) Em contrapartida, quando um composto com um átomo de carbono assimétrico é quimicamente sintetizado em laboratório, então a reação em geral produz todas as formas quirais possíveis: uma mistura de formas D e L, por exemplo. Células vivas produzem somente uma forma quiral de uma dada biomolécula, porque as enzimas que as sintetizam também são quirais.

Estereoespecificidade, a capacidade de distinguir entre estereoisômeros, é uma propriedade das enzimas e de outras proteínas, sendo um aspecto característico da lógica molecular das células vivas. Se o sítio de ligação de uma proteína é complementar a um isômero do composto quiral, então ele não será complementar ao outro isômero, da mesma forma que a luva para a mão esquerda não se ajusta à mão direita. Alguns exemplos marcantes da capacidade dos sistemas biológicos de distinguir estereoisômeros são mostrados na **Figura 1-24**.

As classes comuns de reações químicas encontradas na bioquímica estão descritas no Capítulo 13, a título de introdução às reações do metabolismo.

## RESUMO 1.2 Fundamentos químicos

- Devido a sua versatilidade de ligação, o carbono pode produzir amplas coleções de estruturas carbono-carbono com uma grande variedade de grupos funcionais;

(*R*)-Carvona
(hortelã)

(*S*)-Carvona
(cominho)

**(a)**

L-Aspartil-L-fenilalanina metil éster
(aspartame) (doce)

L-Aspartil-D-fenilalanina metil éster
(amargo)

**(b)**

(*S*)-Citalopram
(terapeuticamente ativo)

(*R*)-Citalopram
(terapeuticamente inativo)

**(c)**

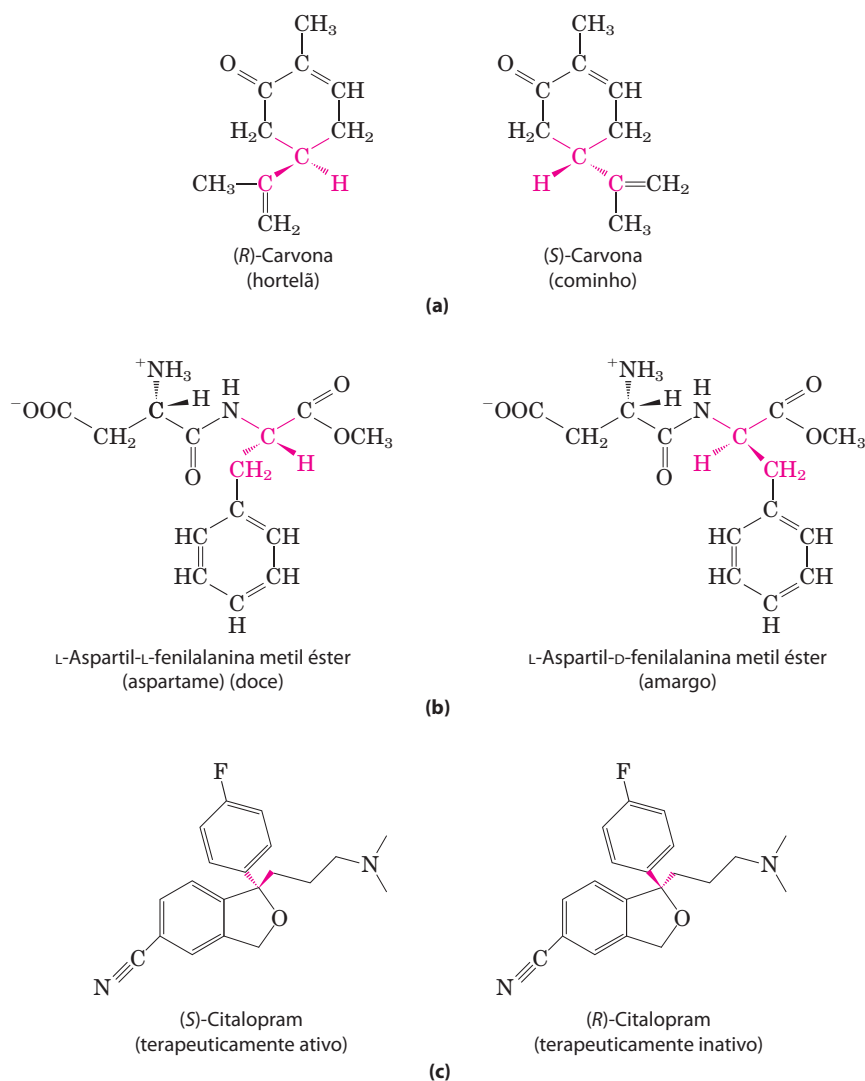



**FIGURA 1-24 Estereoisômeros têm diferentes efeitos em humanos. (a)** Dois estereoisômeros de carvona: (*R*)-carvona (isolado do óleo de hortelã) têm o cheiro característico da hortelã; (*S*)-carvona (isolado do óleo de sementes de cominho) tem o cheiro de cominho. **(b)** O aspartame, adoçante artificial, é facilmente distinguível, pelos receptores de gosto, do seu estereoisômero de gosto amargo, apesar de os dois diferirem apenas pela configuração de um dos seus dois carbonos quirais. **(c)** O medicamento antidepressivo citalopram (nome comercial Celexa), inibidor seletivo da recaptação da serotonina, é uma mistura racêmica dos dois estereoisômeros, mas somente (*S*)-citalopram tem efeito terapêutico. A preparação estereoquimicamente pura de (*S*)-citalopram (oxalato de citalopram) é vendida sob o nome comercial de Lexapro. Como se pode prever, a dose efetiva de Lexapro é a metade da dose efetiva de Celexa.

esses grupos conferem às biomoléculas as suas propriedades químicas e biológicas.

- Um conjunto universal de aproximadamente mil moléculas pequenas é encontrado em células vivas; a interconversão dessas moléculas nas rotas metabólicas centrais se conservou ao longo da evolução.
- Proteínas e ácidos nucleicos são polímeros lineares feitos de subunidades monoméricas simples; suas sequências contêm as informações que fornecem a cada molécula sua estrutura tridimensional e suas funções biológicas.
- A configuração molecular pode ser alterada somente mediante quebra de ligações covalentes. Para um átomo de carbono com quatro substituintes diferentes (carbono quiral), os grupos substituintes podem ser arranjados em duas diferentes formas, gerando estereoisômeros com propriedades distintas. Somente um dos estereoisômeros é biologicamente ativo. A conformação molecular é a disposição dos átomos no espaço que pode ser mudada por rotação em torno de ligações simples, sem quebrar ligações covalentes.
- Interações entre moléculas biológicas são quase invariavelmente estereoespecíficas: elas requerem um ajuste próximo entre as estruturas complementares das moléculas interagentes.

## 1.3 Fundamentos físicos

Células e organismos vivos precisam realizar trabalho para se manterem vivos e se reproduzir. As reações de síntese que ocorrem dentro das células, como processos de síntese em uma fábrica, exigem o consumo de energia. O consumo de energia também é necessário para o movimento de uma bactéria, de um velocista olímpico, para o brilho de um vaga-lume ou para a descarga elétrica de um peixe elétrico. O armazenamento e a expressão de informação requerem energia, sem a qual estruturas ricas em informação inevitavelmente se tornam desordenadas e sem sentido.

No curso da evolução, as células desenvolveram mecanismos altamente eficientes para aproveitar a energia, obtida da luz solar ou de combustíveis químicos nos vários processos que requerem energia para ser realizados. Um dos objetivos da bioquímica é compreender, em termos químicos e quantitativos, os meios pelos quais a energia é extraída, armazenada e canalizada para trabalho útil nas cé-

lulas vivas. As conversões de energia celular – como todas as outras conversões de energia – podem ser estudadas no contexto das leis da termodinâmica.

## Os organismos vivos existem em um estado estacionário dinâmico e nunca em equilíbrio com o seu meio

As moléculas e os íons contidos nos organismos vivos diferem em tipo e concentração daqueles existentes no meio circundante. Um paramécio em uma lagoa, um tubarão no oceano, uma bactéria no solo, uma macieira no pomar – todos são diferentes na composição se comparados com o seu meio, e uma vez atingida a sua maturidade, eles mantêm uma composição aproximadamente constante, apesar das constantes alterações no meio onde se encontram.

Apesar de a composição característica de um organismo mudar relativamente pouco ao longo do tempo, a população de moléculas dentro de um organismo está muito longe do estado estático. Pequenas moléculas, macromoléculas e complexos supramoleculares são continuamente sintetizados e degradados em reações químicas que envolvem um constante fluxo de massa e energia pelo sistema. As moléculas de hemoglobina que carregam oxigênio dos seus pulmões para o seu cérebro neste momento foram sintetizadas no decorrer do último mês; no decorrer do próximo mês, elas serão todas degradadas e completamente substituídas por novas moléculas de hemoglobina. A glicose que você ingeriu na sua última refeição está agora circulando na sua corrente sanguínea; antes do final do dia, essas moléculas de glicose em particular estarão todas convertidas em algo diferente – dióxido de carbono ou gordura, talvez – sendo substituídas por um novo suprimento de glicose, de forma que a concentração de glicose sanguínea é mais ou menos constante ao longo de todo o dia. As quantidades de hemoglobina e glicose no sangue permanecem quase constantes porque a taxa de síntese ou ingestão de cada uma contrabalança a sua taxa de degradação, consumo ou conversão em algum outro produto. A constância da concentração é o resultado do *estado estacionário dinâmico*, um estado estacionário que está fora do equilíbrio. A manutenção desse estado requer investimento constante de energia; quando a célula não consegue mais obter energia, ela morre e começa a decair para o estado de equilíbrio com o seu meio. A seguir será discutido o significado exato de "estado estacionário" e "equilíbrio".

## Os organismos transformam energia e matéria de seu meio

Para as reações químicas que ocorrem em solução, pode-se definir o **sistema** como todos os reagentes e produtos, o solvente que os contêm e a atmosfera imediata – em resumo, tudo dentro de uma região definida do espaço. O sistema e o seu meio juntos constituem o **universo**. Se o sistema não troca nem matéria nem energia com seu meio, então é chamado de **isolado**. Se o sistema troca energia, mas não troca matéria com seu meio, então é **fechado**; se ele troca energia e matéria com seu meio, então ele é um sistema **aberto**.

Um organismo vivo é um sistema aberto; ele troca tanto matéria quanto energia com seu meio. Organismos obtêm energia do meio de duas formas: (1) absorvendo combustíveis químicos (como glicose) do seu meio e extraindo energia pela oxidação desses combustíveis (ver Quadro 1-3, Caso 2), ou (2) absorvendo energia da luz solar.

A primeira lei da termodinâmica descreve o princípio da conversão de energia: *em qualquer mudança física ou química, a quantidade total de energia no universo permanece constante, embora a forma da energia possa mudar*. Isso significa que, quando a energia é "usada" pelo sistema, ela não é "gasta", mas convertida de uma forma em outra – por exemplo, da energia potencial das ligações químicas em energia cinética de calor e movimento. As células contêm sofisticados processos conversores de energia, capazes de interconverter energia química, eletromagnética, mecânica e osmótica entre si com alta eficiência (**Figura 1-25**).

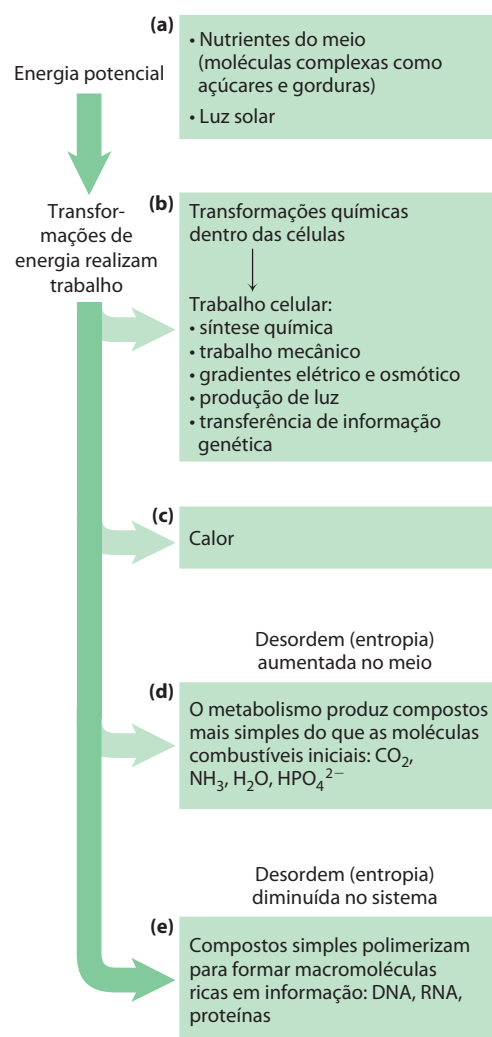



**FIGURA 1-25 Algumas interconversões de energia em organismos vivos.** À medida que a energia metabólica é gasta para realizar o trabalho celular, o grau de desordem do sistema "mais" o do meio externo (expresso quantitativamente como entropia) cresce à medida que a energia potencial das moléculas nutrientes complexas decresce. **(a)** Organismos vivos extraem energia do seu meio; **(b)** convertem parte dela em formas de energia utilizáveis para produzir trabalho; **(c)** devolvem parte da energia ao meio na forma de calor; e **(d)** liberam, como produto final, moléculas que são menos organizadas do que o combustível de partida, aumentando a entropia do universo. Um efeito de todas estas transformações é **(e)** o aumento da ordem (aleatoriedade diminuída) do sistema na forma de macromoléculas complexas. O tratamento quantitativo da entropia será retomado no Capítulo 13.

## QUADRO 1-3 Entropia: as vantagens de ser desorganizado

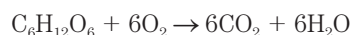
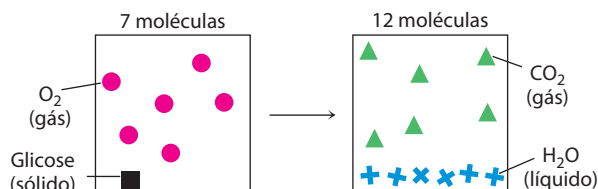
O termo “entropia”, que literalmente significa “mudança em seu interior”, foi usado pela primeira vez em 1851 por Rudolf Clausius, um dos formuladores da segunda lei da termodinâmica. Uma definição quantitativa rigorosa de entropia envolve considerações probabilísticas e estatísticas. Entretanto, sua natureza pode ser ilustrada qualitativamente por três exemplos simples, cada um demonstrando um aspecto da entropia. A chave para a descrição de entropia é a *aleatoriedade* e a *desordem,* manifestadas de diferentes maneiras.

**Caso 1: A chaleira e a dissipação do calor**

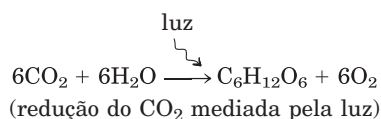
Sabe-se que o vapor gerado na água em ebulição pode realizar trabalho útil. Contudo, suponha que a chama sob a chaleira cheia de água a 100°C (“sistema”) seja apagada na cozinha (“o meio”). À medida que a água da chaleira esfria, nenhum trabalho é feito, mas o calor passa da chaleira para o meio, aumentando a temperatura do meio (cozinha) por uma quantidade infinitesimal até que o equilíbrio completo é alcançado. Nesse momento, todas as partes da chaleira e da cozinha estão precisamente na mesma temperatura. A energia livre que estava concentrada na chaleira com água a 100°C, potencialmente capaz de realizar trabalho, desapareceu. O seu equivalente de energia calorífica continua presente na chaleira + cozinha (i.e., “universo”), mas tornou-se completamente aleatório. Essa energia não está mais disponível para realizar trabalho porque não existem mais diferenças de temperatura dentro da cozinha. Além disso, o aumento da entropia da cozinha (o meio) é irreversível. Sabe-se pela experiência do cotidiano que o calor nunca passa espontaneamente da cozinha de volta para a chaleira para aumentar novamente a temperatura da água a 100°C.

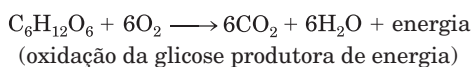
**Caso 2: A oxidação da glicose**

Entropia é um estado não somente da energia, mas da matéria. Organismos aeróbios (heterotróficos) extraem energia livre da glicose obtida do meio pela oxidação da glicose com $O_2$, que também é obtido do meio. Os produtos finais desse metabolismo oxidativo, $CO_2$ e $H_2O$, retornam ao meio. Nesse processo, o meio sofre um aumento de entropia, enquanto o organismo permanece em estado estacionário e não sofre mudanças em sua ordem interna. Apesar de alguma entropia surgir da dissipação do calor, a entropia resulta também de outro tipo de desordem, ilustrado pela equação da oxidação da glicose:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

Pode-se representar isto esquematicamente como

## O fluxo de elétrons fornece energia aos organismos

Praticamente todos os organismos vivos obtêm sua energia, direta ou indiretamente, da energia radiante da luz solar. Nos fotoautotróficos, a ruptura da molécula da água promovida pela luz durante a fotossíntese libera seus elétrons para a redução do $CO_2$ e a liberação de oxigênio na atmosfera:

$$6CO_2 + 6H_2O \xrightarrow{\text{luz}} C_6H_{12}O_6 + 6O_2$$
(redução do $CO_2$ mediada pela luz)

Organismos não fotossintéticos (quimiotróficos) obtêm a energia que necessitam da oxidação de produtos ricos em energia armazenados em plantas e resultantes da fotossíntese, passando então os elétrons adquiridos ao $O_2$ atmosférico para formar água, $CO_2$ e outros produtos finais, que são reciclados no meio ambiente.

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O + \text{energia}$$
(oxidação da glicose produtora de energia)

Portanto, autótrofos e heterótrofos participam do ciclo global de $O_2$ e $CO_2$, propulsionado em última instância pela luz solar, tornando esses dois grandes grupos de organismos interdependentes. Praticamente toda a transdução de energia nas células pode ser relacionada a esse fluxo de elétrons de uma molécula a outra, onde a energia potencial eletroquímica “escorrega” de um potencial eletroquímico mais alto para um mais baixo; de forma análoga ao fluxo de elétrons em um circuito elétrico acionado por uma pilha. Todas essas reações envolvidas no fluxo de elétrons são **reações de oxirredução**: um reagente é oxidado (perda de elétrons) enquanto outro é reduzido (ganho de elétrons).

## Criar e manter ordem requer trabalho e energia

Como destacado, DNA, RNA e proteínas são macromoléculas de informação; a sequência exata de suas subunidades monoméricas contém informação, tal como as letras desta frase. Além de usar energia química para formar ligações covalentes entre essas subunidades, as células precisam investir energia para ordenar as subunidades em sua sequência correta. É extremamente improvável que aminoácidos em uma mistura venham a se condensar espontaneamente em um único tipo de proteína, com uma sequência única. Isso representa aumento da ordem em uma população de moléculas; contudo, de acordo com a segunda lei da termo-

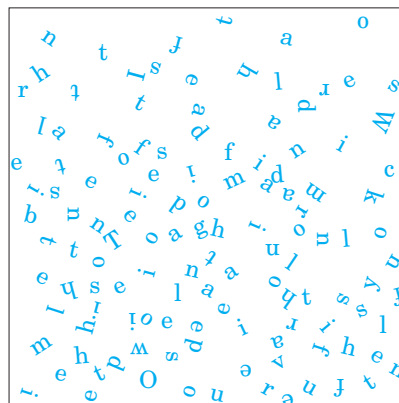
Os átomos contidos em 1 molécula de glicose mais 6 moléculas de oxigênio, um total de 7 moléculas, passam a ficar dispersos de forma mais aleatória após a reação de oxidação, passando para um total de 12 moléculas ($6CO_2 + 6H_2O$).

Sempre que uma reação química resultar no aumento do número de moléculas – ou quando uma substância sólida é convertida em produtos líquidos ou gasosos, que permitem maior liberdade de movimentação molecular que os sólidos – a desordem molecular aumenta e, em consequência, a entropia também aumenta.

**Caso 3: Informação e entropia**

A seguinte fala da peça *Júlio Cesar*, ato IV, Cena 3, é enunciada por Brutus, quando ele percebe que precisa enfrentar o exército de Marco Antônio. Ela é um arranjo não aleatório e rico em informações feito de 125 letras do alfabeto inglês:

*There is a tide in the affairs of men,*
*Which, taken at the flood, leads on to fortune;*
*Omitted, all the voyage of their life*
*Is bound in shallows and in miseries.*

Além do que esse trecho afirma abertamente, carrega muitos significados ocultos, não somente refletindo uma complexa sequência de eventos na peça, mas também ecoando as ideias da peça sobre conflito, ambição e a demanda por liderança. Permeada com a compreensão de Shakespeare sobre a natureza humana, ela é muito rica em informação.

Contudo, se essas 125 letras que fazem essa citação forem distribuídas em um padrão completamente aleatório e caótico, como mostrado no quadro acima, elas não terão qualquer significado.

Assim, as 125 letras contêm pouca ou nenhuma informação, mas são muito ricas em entropia. Tais considerações levaram à conclusão de que a informação é uma forma de energia, tendo sido denominada "entropia negativa". De fato, o ramo da matemática denominado teoria da informação, que é básico para a programação lógica de computadores, está intimamente relacionado à teoria termodinâmica. Organismos vivos são estruturas altamente organizadas, não aleatórias, imensamente ricas em informação e, portanto, pobres em entropia.

dinâmica, a tendência na natureza é mover-se no sentido oposto, sempre de maior desordem no universo: *a entropia total do universo está continuamente aumentando*. Para sintetizar macromoléculas a partir de suas unidades monoméricas, energia livre precisa ser injetada no sistema (neste caso, a célula).

**CONVENÇÃO-CHAVE:** A aleatoriedade ou a desordem dos componentes de um sistema químico é expressa como **entropia**, ***S*** (Quadro 1-3). Qualquer alteração na aleatoriedade do sistema é expressa como variação de entropia, $\Delta S$, que, por convenção, possui um sinal positivo quando a aleatoriedade aumenta. J. Willard Gibbs, que desenvolveu a teoria da variação de energia durante as reações químicas, demonstrou que a **energia livre total, *G***, de qualquer sistema fechado pode ser definida em termos de três quantidades: **entalpia, *H***, que expressa o número e os tipos de ligações; entropia, $S$; e a temperatura absoluta, $T$ (em Kelvin).

J. Willard Gibbs, 1839-1903

A definição de energia livre é $G = H - TS$. Quando uma reação química ocorre a uma temperatura constante, a **variação da energia livre**, $\Delta G$, é determinada pela variação da entalpia, $\Delta H$, refletindo o tipo e o número das ligações químicas e a formação e a quebra de interações não covalentes, e a variação da entropia, $\Delta S$, que descreve a variação da aleatoriedade do sistema:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

onde, por definição, $\Delta H$ é negativo para uma reação que libera calor (reação exotérmica), $\Delta H$ é positivo para uma reação que absorve calor (reação endotérmica) e $\Delta S$ é positivo para uma reação que aumenta a aleatoriedade do sistema (diminui a ordem). ■

Um processo tende a ocorrer espontaneamente somente se $\Delta G$ for negativo (se energia livre é liberada no processo). Já o funcionamento da célula depende basicamente de moléculas, como proteínas e ácidos nucleicos, para as quais a energia livre de formação é positiva: as moléculas são menos estáveis e mais altamente ordenadas do que a mistura de seus componentes monoméricos. Para que essas reações, consumidoras de energia (**endergônicas**) e, portanto, termodinamicamente desfavoráveis, ocorram, as células as acoplam a outras reações que liberam energia (reações

P—P—P—Adenosina (Trifosfato de adenosina, ATP)

$^{-}O-P(O^{-})(=O)-OH$ + P—P—Adenosina (Difosfato de adenosina, ADP)

Fosfafo inorgânico ($P_i$)

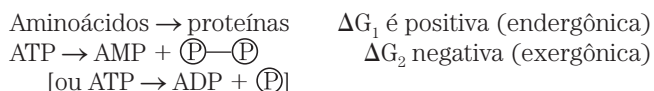
$^{-}O-P(OH)(=O)-O-P(O^{-})(=O)-OH$ + P—Adenosina (Monofosfato de adenosina, AMP)

Pirofosfato inorgânico ($PP_i$)

**FIGURA 1-26 O trifosfato de adenosina (ATP) fornece energia.** Aqui cada P representa um grupo fosforila. A remoção do grupo fosforila terminal (sombreado em cor salmão) do ATP, pela quebra da ligação fosfoanidrido para gerar difosfato de adenosina (ADP) e o íon fosfato inorgânico ($HPO_4^{2-}$), é altamente exergônica; essa reação costuma ser acoplada a várias reações endergônicas nas células (como no exemplo da Figura 1-27b). O ATP também fornece energia para vários processos celulares pela clivagem que libera os dois fosfatos terminais, resultando em pirofosfato inorgânico ($H_2P_2O_7^{2-}$), frequentemente abreviado como $PP_i$.

**exergônicas**), de forma que o processo como um todo é exergônico: a *soma* da variação da energia livre é negativa.

A fonte costumeira de energia livre em reações biológicas acopladas é a energia liberada pela quebra (de fato hidrólise) das ligações fosfoanidrido como aquelas presentes no trifosfato de adenosina (ATP; **Figura 1-26**) e no trifosfato de guanosina (GTP). Aqui, cada P representa um grupo fosforila:

Aminoácidos ⟶ proteínas $\Delta G_1$ é positiva (endergônica)
ATP ⟶ AMP + Ⓟ—Ⓟ $\Delta G_2$ negativa (exergônica)
[ou ATP ⟶ ADP + Ⓟ]

Quando essas reações estão acopladas, então a soma de $\Delta G_1$ com $\Delta G_2$ é negativa – o processo como um todo é exergônico. Por esta estratégia de acoplamento, as células conseguem sintetizar e manter os polímeros ricos em informação essenciais para a vida.

## Reações com ligações de acoplamento energético na biologia

A questão central em *bioenergética* (estudo da transformação de energia em sistemas vivos) é o meio através do qual a energia do metabolismo energético ou da captura de luz é acoplada às reações celulares que requerem energia. Ao pensar em acoplamento energético, é útil considerar um exemplo mecânico simples, como mostra a **Figura 1-27a**. Um objeto no topo de um plano inclinado tem certa quantidade de energia potencial como consequência de sua elevação. Ele tende a deslizar para baixo ao longo do plano, perdendo sua energia potencial de posição à medida que

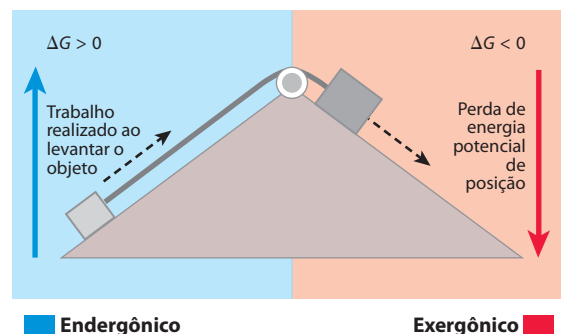
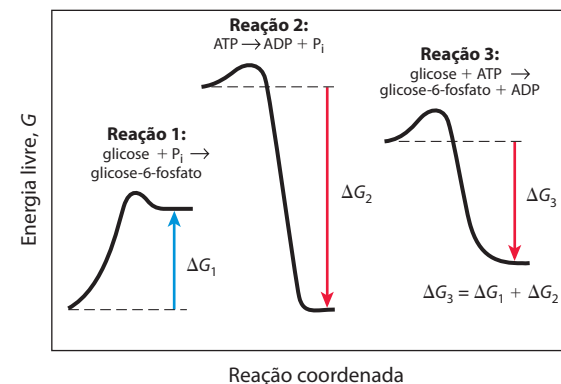



**FIGURA 1-27 Acoplamento energético em processos químicos e mecânicos.** **(a)** O movimento de queda de um objeto libera energia potencial que pode realizar trabalho mecânico. A energia potencial disponibilizada pelo movimento de queda espontânea, no processo exergônico (vermelho), pode ser acoplada ao processo endergônico representado pelo movimento ascendente de um segundo objeto (azul). **(b)** Na reação 1, a formação de glicose-6-fosfato a partir da glicose e do fosfato inorgânico ($P_i$) gera um produto com conteúdo energético maior que o dos reagentes. Para esta reação endergônica, $\Delta G$ é positivo. Na reação 2, a quebra exergônica do trifosfato de adenosina (ATP) tem uma grande variação negativa de energia livre ($\Delta G_2$). A terceira reação é a soma das reações 1 e 2, e a variação da energia livre, $\Delta G_3$, é a soma aritmética de $\Delta G_1$ e $\Delta G_2$. Pelo fato de $\Delta G_3$ ser negativo, o processo como um todo é exergônico e ocorre espontaneamente.

se aproxima do solo. Quando um mecanismo com corda de puxar apropriado acopla o objeto em queda a outro, menor, então o movimento de deslize espontâneo do maior pode levantar o menor, realizando certa quantidade de trabalho. A quantidade de energia disponível para realizar trabalho é a **variação de energia livre**, $\Delta G$, sendo sempre um pouco menor do que a quantidade teórica de energia liberada, porque um pouco de energia é dissipado como calor decorrente do atrito. Quanto maior a elevação de um objeto grande, maior será a energia liberada ($\Delta G$) com o deslizamento e maior a quantidade de trabalho que poderá ser realizado. O objeto grande pode levantar o menor somente porque, no início, o objeto grande estava *longe da sua posição de equilíbrio*: ele foi, em algum momento anterior, elevado acima do solo, processo que precisou da injeção de energia.

Como isso se aplica às reações químicas? Em sistemas fechados, as reações químicas ocorrem espontaneamente até que o **equilíbrio** seja alcançado. Quando um sistema está em equilíbrio, a taxa de formação de produtos se iguala exatamente à taxa na qual os produtos são convertidos em reagentes. Portanto, não existe uma variação líquida na concentração de reagentes e produtos. Quando um sistema se move do estado inicial ao estado de equilíbrio, então a variação de energia é dada pela variação de energia livre, $\Delta G$, quando não existe variação de temperatura ou pressão. A magnitude de $\Delta G$ depende da reação química em particular *e o quão longe do equilíbrio o sistema inicialmente estava*. Cada composto envolvido em uma reação química contém certa quantidade de energia potencial, relacionada ao tipo e ao número das suas ligações. Nas reações que ocorrem espontaneamente, os produtos têm menos energia livre que os reagentes; portanto, a reação libera energia livre que, por sua vez, está disponível para realizar trabalho. Essas reações são exergônicas (ou exotérmicas); o declínio na energia livre dos reagentes para os produtos é expresso como um valor negativo. Reações endergônicas (ou endotérmicas) requerem uma injeção de energia, e seus valores de $\Delta G$ são positivos. Assim como no processo mecânico, somente parte da energia liberada na reação química exergônica pode ser utilizada para realizar trabalho. Em sistemas vivos, parte da energia é dissipada como calor ou perdida como incremento de entropia.

## $K_{eq}$ e $\Delta G°$ são medidas da tendência das reações ocorrerem espontaneamente

A tendência de uma reação química em se completar pode ser expressa como uma constante de equilíbrio. Para uma reação na qual uma quantidade de *a* mols de A reagem com *b* mols de B para dar *c* mols de C e *d* mols de D,

$$aA + bB \longrightarrow cC + dD$$

a constante de equilíbrio, $K_{eq}$, é dada por

$$K_{eq} = \frac{[C]^c_{eq}[D]^d_{eq}}{[A]^a_{eq}[B]^b_{eq}}$$

onde $[A]_{eq}$ é a concentração de A, $[B]_{eq}$ é a concentração de B, e assim por diante, *quando o sistema alcançou o equilíbrio*. Um grande valor de $K_{eq}$ significa que a reação tende a prosseguir até que os reagentes estejam quase completamente convertidos nos produtos.

**PROBLEMA RESOLVIDO 1-1** **ATP e ADP estão em equilíbrio nas células?**

A constante de equilíbrio, $K_{eq}$, para a reação seguinte é de $2 \times 10^5$ M:

$$ATP \longrightarrow ADP + HPO_4^{2-}$$

Se as concentrações celulares medidas são [ATP] = 5 mM, [ATP] = 0,5 mM e $[P_i]$ = 5 mM, então estaria esta reação em equilíbrio na célula?

**Solução:** A definição de constante de equilíbrio para esta reação é:

$$K_{eq} = [ADP][P_i]/[ATP]$$

Das concentrações celulares medidas e dadas acima, pode-se calcular a razão ação das massas, $Q$:

$$Q = [ADP][P_i]/[ATP] = 0{,}5 \text{ mM} \times 5 \text{ mM} / 5 \text{ mM}$$
$$= 0{,}5 \text{ mM} = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$$

Este valor está bem *longe* da constante de equilíbrio para a reação ($2 \times 10^5$ M), portanto a reação está muito longe do equilíbrio nas células. [ATP] está muito alto e [ADP] muito abaixo do esperado para o equilíbrio. Como pode uma célula manter a razão [ATP]/[ADP] tão longe do equilíbrio? Ela o faz mediante a contínua extração de energia (de nutrientes como glicose) e a utilizando para fazer ATP a partir de ADP e $P_i$.

**PROBLEMA RESOLVIDO 1-2** **A reação de hexocinase está em equilíbrio nas células?**

Para a reação catalisada pela enzima hexocinase, tem-se:

$$\text{Glicose} + \text{ATP} \longrightarrow \text{glicose-6-fosfato} + \text{ADP}$$

A constante de equilíbrio, $K_{eq}$, é $7{,}8 \times 10^2$. Em células de *E. coli* vivas, [ATP] = 5 mM; [ADP] = 0,5 mM; [glicose] = 2 mM; e [glicose-6-fosfato] = 1 mM. A reação está em equilíbrio em *E. coli*?

**Solução:** No equilíbrio,

$$K_{eq} = 7{,}8 \times 10^2 = [\text{ADP}][\text{glicose-6-fosfato}]/[\text{ATP}][\text{glicose}]$$

Em células vivas, [ADP][glicose-6-fosfato]/[ATP][glicose] = (0,5 mM × 1 mM) / (5 mM × 2 mM) = 0,05. A reação está, portanto, *afastada* do equilíbrio: a concentração celular dos produtos (glicose-6-fosfato e ADP) está muito mais baixa que o esperado no equilíbrio e a dos reagentes, muito mais alta. Logo, a reação tende fortemente a se deslocar à direita.

Gibbs mostrou que $\Delta G$ (a variação da energia livre) para qualquer reação química é uma função da variação da **energia livre padrão**, $\Delta G°$ – constante característica de cada reação específica – e um termo que expressa a concentração inicial de reagentes e produtos:

$$\Delta G = \Delta G° + RT \ln \frac{[C]^c_i[D]^d_i}{[A]^a_i[B]^b_i} \quad (1\text{-}1)$$

onde $[A]_i$ é a concentração inicial de A, e assim por diante; $R$ é a constante dos gases; e $T$ é a temperatura absoluta.

$\Delta G$ é uma medida da distância de um sistema da sua posição de equilíbrio. Quando uma reação já alcançou o equilíbrio, nenhuma força permanece e não consegue mais realizar trabalho: $\Delta G = 0$. Para este caso especial, $[A]_i = [A]_{eq}$, e assim por diante, para todos os reagentes e produtos, e

$$\frac{[C]_i^c[D]_i^d}{[A]_i^a[B]_i^b} = \frac{[C]_{eq}^c[D]_{eq}^d}{[A]_{eq}^a[B]_{eq}^b}$$

Substituindo $\Delta G$ por 0 e $[C]_i^c[D]_i^d/[A]_i^a\,[B]_i^b$ por $K_{eq}$ na Equação 1-1, obtém-se a relação

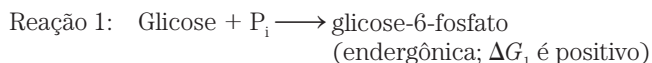
$$\Delta G° = -RT \ln K_{eq}$$

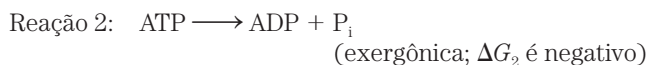
da qual pode-se ver que $\Delta G°$ é simplesmente uma segunda maneira (além de $K_{eq}$) de expressar a força de condução de uma reação. Pelo fato de $K_{eq}$ poder ser experimentalmente medido, então $\Delta G°$, que é a constante termodinâmica característica de cada reação, pode ser determinada.

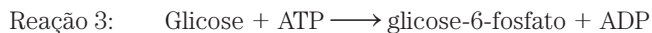
As unidades de $\Delta G°$ e $\Delta G$ são joules por mol (ou calorias por mol). Quando $K_{eq} >> 1$, $\Delta G°$ é maior em módulo e negativo; quando $K_{eq} << 1$, então $\Delta G°$ é maior e positivo. A partir de uma tabela de valores, tanto de $K_{eq}$ ou $\Delta G°$, determinados experimentalmente, pode-se ver quais reações tendem a se completar e quais não.

Um cuidado deve ser tomado a respeito da interpretação de $\Delta G°$: constantes *termodinâmicas* como estas indicam onde o equilíbrio final de uma reação se encontra, mas não com que rapidez esse equilíbrio vai ser alcançado. As velocidades das reações são governadas pelos parâmetros cinéticos, tópico que será considerado em detalhes no Capítulo 6.

Nos organismos biológicos, como no exemplo matemático da Figura 1-27a, uma reação exergônica pode ser acoplada a uma reação endergônica para empurrar reações que seriam desfavoráveis. A Figura 1-27b (tipo de gráfico chamado de diagrama de coordenada da reação) ilustra esse princípio para a conversão da glicose em glicose-6-fosfato, o primeiro passo da rota da oxidação da glicose. A forma mais simples de produzir glicose-6-fosfato seria:

Reação 1: Glicose + $P_i \longrightarrow$ glicose-6-fosfato
(endergônica; $\Delta G_1$ é positivo)

(Aqui, $P_i$ é uma abreviação para fosfato inorgânico, $HPO_4^{2-}$. Não se preocupe com a estrutura desses compostos agora, pois serão descritos em detalhe adiante neste livro.) Essa reação não ocorre espontaneamente; $\Delta G_1$ é positivo. Uma segunda reação muito exergônica pode ocorrer em todas as células:

Reação 2: ATP $\longrightarrow$ ADP + $P_i$
(exergônica; $\Delta G_2$ é negativo)

Essas duas reações químicas compartilham um intermediário comum, $P_i$, o qual é consumido na reação 1 e produzido na reação 2. Portanto, as duas reações podem ser acopladas na forma de uma terceira reação, que pode ser escrita como a soma das reações 1 e 2, com o intermediário comum, $P_i$, omitido de ambos os lados da equação:

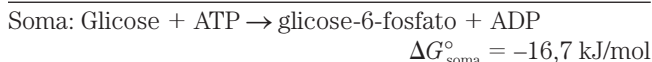
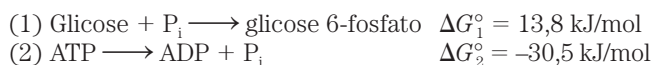
Reação 3: Glicose + ATP $\longrightarrow$ glicose-6-fosfato + ADP

Pelo fato de mais energia ser liberada na reação 2 do que é consumida na reação 1, a energia livre para a reação 3, $\Delta G_3$, é negativo, e a síntese de glicose-6-fosfato pode consequentemente ocorrer na reação 3.

**PROBLEMA RESOLVIDO 1-3** **As variações de energia livre são aditivas**

Dado que a variação da energia padrão para a reação glicose + $P_i \longrightarrow$ glicose-6-fosfato é 13,8 kJ/mol e que a variação da energia livre padrão da reação ATP $\longrightarrow$ ADP + $P_i$ é –30,5 kJ/mol, qual é a variação da energia livre para a reação glicose + ATP $\longrightarrow$ glicose-6-fosfato + ADP?

**Solução:** É possível escrever a equação para esta reação como a soma de duas outras reações:

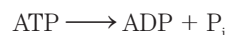
(1) Glicose + $P_i \longrightarrow$ glicose 6-fosfato $\quad \Delta G_1° = 13{,}8$ kJ/mol
(2) ATP $\longrightarrow$ ADP + $P_i$ $\quad \Delta G_2° = -30{,}5$ kJ/mol

Soma: Glicose + ATP $\rightarrow$ glicose-6-fosfato + ADP
$\Delta G°_{soma} = -16{,}7$ kJ/mol

A variação da energia livre padrão de duas reações que se somam resultando em uma terceira é simplesmente a soma das duas reações individuais. Um valor negativo para $\Delta G°$ (–16,7 kJ/mol) indica que a reação tende a ocorrer espontaneamente.

O acoplamento de reações exergônicas e endergônicas por meio de um intermediário comum é central nas trocas de energia nos sistemas vivos. Como será visto, reações que quebram ATP (como a reação 2 da Figura 1-27b) liberam energia que impelem muitos processos endergônicos nas células. A quebra de ATP nas células é exergônica porque *todos os seres vivos mantêm a concentração do ATP bem acima da sua concentração de equilíbrio*. É este desequilíbrio que permite ao ATP servir como principal carregador de energia nas células. Como será visto em mais detalhes no Capítulo 13, não é a mera quebra de ATP que fornece energia para realizar as reações endergônicas; em vez disso, é a *transferência do grupo fosforila* do ATP para outra pequena molécula (glicose no caso acima) que conserva uma parte da energia potencial original no ATP.

**PROBLEMA RESOLVIDO 1-4** **O custo energético da síntese de ATP**

Se a constante de equilíbrio, $K_{eq}$, para a reação

$$\text{ATP} \longrightarrow \text{ADP} + P_i$$

é $2{,}22 \times 10^5$ M, calcule a variação da energia livre padrão, $\Delta G°$, para a *síntese* de ATP a partir de ADP e $P_i$ a 25° C.

**Solução:** Primeiro calcule $\Delta G°$ para a reação acima.

$$\begin{aligned}\Delta G° &= -RT \ln K_{eq}\\ &= -(8{,}315 \text{ J/mol} \cdot \text{K})(298 \text{ K})(\ln 2{,}22 \times 10^5)\\ &= -30{,}5 \text{ kJ/mol}\end{aligned}$$

Essa é a variação da energia livre padrão para a quebra de ATP em ADP e $P_i$. A variação da energia livre padrão para a reação *inversa* tem o mesmo valor absoluto, mas de sinal contrário. A variação da energia livre padrão para o inverso da reação apresentada é, portanto, 30,5 kJ/mol. Portanto, para sintetizar 1 mol de ATP sob condições normais (25° C, concentração 1 M de ATP, ADP e $P_i$), no mínimo 30,5 kJ de energia deve ser fornecida. De fato, a variação de energia livre nas células – aproximadamente 50 kJ/mol – é maior do que isso, porque as concentrações de ATP, ADP e $P_i$ nas células não são o padrão 1 M (ver Problema Resolvido 13-2, p. 519).

**PROBLEMA RESOLVIDO 1-5** **Variação da energia livre padrão para a síntese de glicose-6-fosfato**

Qual é a variação da energia livre padrão, $\Delta G°$, sob condições fisiológicas (*E. coli* cresce no intestino humano à 27°C) para a reação seguinte?

$$\text{Glicose} + \text{ATP} \longrightarrow \text{glicose-6-fosfato} + \text{ADP}$$

**Solução:** Tem-se a relação $\Delta G° = -RT \ln K_{eq}$ e o valor de $K_{eq}$ para esta reação, $7{,}8 \times 10^2$. Substituindo os valores de $R$, $T$ e $K_{eq}$ na equação resulta:

$$\Delta G° = -(8{,}315\ \text{J/mol}\cdot\text{K})(310\ \text{K})(\ln 7{,}8 \times 10^2) = -17\ \text{kJ/mol}$$

Note que esse valor é levemente diferente daquele do Problema Resolvido 1-3. Naquele cálculo, assumiu-se uma temperatura de 25°C (298 K), ao passo que neste cálculo foi utilizada a temperatura fisiológica de 37°C (310 K).

## As enzimas promovem sequências de reações químicas

Todas as macromoléculas biológicas são muito menos estáveis termodinamicamente se comparadas com suas unidades monoméricas, mas mesmo assim elas são *cineticamente estáveis*: suas quebras *não catalisadas* ocorrem tão lentamente (ao longo de anos em vez de segundos) que, em uma escala de tempo típica de organismos vivos, essas moléculas podem ser consideradas estáveis. Praticamente todas as reações químicas das células ocorrem em uma taxa significativa somente quando na presença das **enzimas** – biocatalisadores que, como todos os outros catalisadores, aumentam bastante a velocidade de reações químicas específicas sem, contudo, serem consumidos no processo.

O caminho de reagente(s) a produto(s) invariavelmente envolve uma barreira energética, chamada de potencial de ativação (**Figura 1-28**), que precisa ser superada para que alguma reação ocorra. A quebra de ligações existentes e a formação de novas geralmente requer, em primeiro lugar, a modificação das ligações existentes para criar um **estado de transição** que tem energia livre maior que a dos reagentes ou produtos. O ponto mais alto no diagrama da coordenada de reação representa o estado de transição, e a diferença de energia entre o reagente no seu estado fundamental e em seu estado de transição consiste na **energia de ativação**, $\Delta G^{\ddagger}$. Uma enzima catalisa a reação

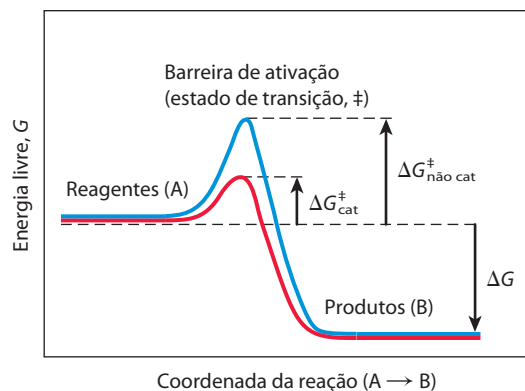



**FIGURA 1-28 A energia se altera durante uma reação química.** Uma barreira de potencial, também chamada de barreira de ativação, representando o estado de transição (ver Capítulo 6), precisa ser superada na conversão dos reagentes (A) nos produtos (B), mesmo que os produtos sejam mais estáveis do que os reagentes, como indicado por uma variação grande e negativa da energia livre ($\Delta G$). A energia necessária para transpor a barreira de potencial é chamada de energia de ativação ($\Delta G^{\ddagger}$). As enzimas catalisam as reações diminuindo as barreiras de potencial. Elas se ligam fortemente aos intermediários dos estados de transição, e a energia de ligação desta interação efetivamente reduz a energia de ativação de $\Delta G^{\ddagger}_{\text{não cat}}$ (curva azul) para $\Delta G^{\ddagger}_{\text{cat}}$ (curva vermelha). (Observe que a energia de ativação não está relacionada à variação da energia livre, $\Delta G$.)

ao prover uma acomodação mais confortável ao estado de transição: uma superfície que complementa o estado de transição em sua estereoquímica, polaridade e carga. A ligação da enzima ao estado de transição é exergônica, e a energia liberada por essa ligação reduz a energia de ativação para a reação, aumentando muito, por consequência, a sua velocidade.

Uma contribuição adicional à catálise ocorre quando dois ou mais reagentes se ligam à superfície da enzima próximos um do outro e em uma orientação estereoespecífica que favorece a reação. Isso aumenta em várias ordens de grandeza a probabilidade de colisões produtivas entre reagentes. Como resultado desses fatores somados com vários outros, discutidos no Capítulo 6, as reações catalisadas por enzimas normalmente ocorrem a velocidades $10^{12}$ vezes mais rápidas que reações não catalisadas. (Isso é um trilhão de vezes mais rápido!)

Catalisadores celulares são, com algumas raras exceções, proteínas. (Algumas moléculas de RNA têm atividade enzimática, como discutido nos Capítulos 26 e 27.) Novamente, com algumas exceções, cada enzima catalisa uma reação específica e cada reação no interior da célula é catalisada por uma enzima diferente. Portanto, milhares de enzimas diferentes são necessárias em cada célula. A multiplicidade de enzimas, sua especificidade (capacidade de diferenciar os reagentes uns dos outros) e sua suscetibilidade de regulação dão às células a capacidade de diminuir seletivamente os potenciais de ativação. Essa seletividade é crucial para a regulação efetiva dos processos celulares. Ao permitir que reações específicas ocorram a velocidades significativas em momentos específicos, as enzimas determinam como a matéria e a energia são canalizadas nas atividades celulares.

Os milhares de reações químicas catalisadas por enzimas nas células são organizadas funcionalmente em muitas sequências de reações consecutivas, chamadas de **rotas**, nas quais o produto de uma reação se torna o reagente da seguinte. Algumas rotas degradam nutrientes orgânicos em produtos finais simples para poder extrair energia química e convertê-la em formas úteis à célula; o conjunto dessas reações degradativas e produtoras de energia livre é designado **catabolismo**. A energia liberada pelas reações catabólicas promove a síntese de ATP. Como resultado, a concentração celular de ATP está bem acima da sua concentração de equilíbrio, de modo que o $\Delta G$ para quebra de ATP é grande e negativo. Similarmente, o catabolismo resulta na produção de carreadores de elétrons reduzidos, NADH e NADPH, ambos podendo doar elétrons em processos que geram ATP ou conduzir etapas redutoras em rotas biossintéticas.

Outras rotas iniciam com moléculas precursoras pequenas e as convertem progressivamente em moléculas maiores e mais complexas, incluindo proteínas e ácidos nucleicos. Tais rotas sintéticas, que invariavelmente requerem injeção de energia, são coletivamente designadas **anabolismo**. O conjunto de redes de rotas catalisadas por enzimas, tanto as catabólicas quanto as anabólicas, constituem o **metabolismo** celular. O ATP (e os nucleosídeos trifosfatados energicamente equivalentes, trifosfato de cistidina [CTP], trifosfato de uridina [UTP] e trifosfato de guanosina [GTP]) é o elo entre os componentes catabólicos e anabólicos dessa rede (mostrado esquematicamente na **Figura 1-29**). As rotas das reações catalisadas por enzimas que atuam sobre os principais constituintes das células – proteínas, gorduras, açúcares e ácidos nucleicos – são praticamente idênticas em todos os organismos vivos.

**FIGURA 1-29 O papel central do ATP e do NAD(P)H no metabolismo.** O ATP é o intermediário químico compartilhado que conecta os processos celulares consumidores e fornecedores de energia. Seu papel na célula é análogo ao do dinheiro na economia: ele é "produzido/adquirido" nas reações exergônicas e "gasto/consumido" nas endergônicas. O NAD(P)H (adenina nicotinamida dinucleotídeo [fosfato]) é um cofator carreador de elétrons que capta elétrons de reações oxidativas e então os doa em uma ampla gama de reações de redução na biossíntese. Esses cofatores essenciais às reações anabólicas, presentes em concentrações relativamente baixas, precisam ser constantemente regenerados pelas reações catabólicas.

## O metabolismo é regulado para obter equilíbrio e economia

As células vivas não só sintetizam de forma simultânea milhares de tipos diferentes de carboidratos, gorduras, proteínas e moléculas de ácidos nucleicos e suas subunidades mais simples, como o fazem nas exatas proporções requeridas pela célula sob uma dada circunstância. Por exemplo, durante o rápido crescimento celular, os precursores de proteínas e ácidos nucleicos devem ser feitos em grandes quantidades, ao passo que, em células que não estão crescendo, a demanda por esses precursores é muito menor. As enzimas-chave em cada rota metabólica são reguladas de modo que cada tipo de molécula precursora seja produzido na quantidade apropriada às demandas momentâneas das células.

Considere, por exemplo, a rota que leva à síntese do aminoácido isoleucina, um constituinte das proteínas, em *E. coli*. A rota tem cinco passos catalisados por cinco enzimas diferentes (A a F representam os intermediários da rota):

Se uma célula começa a produzir mais isoleucina do que ela necessita para a síntese de proteínas, então a isoleucina não usada se acumula, e o acréscimo de sua concentração inibe a atividade catalítica da primeira enzima da rota, causando a imediata desaceleração da produção de isoleucina. Essa **retroalimentação inibitória** mantém a produção e a utilização de cada intermediário em equilíbrio (ao longo do livro, será usado ⊗ para indicar inibição da reação enzimática).

Apesar de o conceito de rota discreta ser uma ferramenta importante para organizar o conhecimento do metabolismo, ele é muito simplificado. Existem milhares de

metabólitos intermediários na célula, muitos dos quais fazem parte de mais de uma rota. O metabolismo seria mais bem representado por uma rede de rotas interconectadas e interdependentes. A mudança na concentração de qualquer metabólito dá início a um efeito de ondulação, influenciando o fluxo de materiais pelas outras rotas. A tarefa de compreender essas complexas interações entre intermediários e rotas em termos quantitativos é desencorajadora, mas a nova ênfase em **biologia de sistemas**, discutida no Capítulo 15, começou a oferecer uma importante compreensão da regulação global do metabolismo.

As células regulam também a síntese de seus próprios catalisadores, as enzimas, em resposta ao aumento ou à diminuição da necessidade de um produto metabólito; esse é o conteúdo do Capítulo 28. A expressão de genes (a tradução da informação contida no DNA em proteínas ativas na célula) e a síntese de enzimas são outros níveis de controle metabólico na célula. Todos os níveis devem ser levados em conta na descrição do controle global do metabolismo celular.

### RESUMO 1.3 Fundamentos físicos

- Células vivas são sistemas abertos, que trocam matéria e energia com o meio externo, extraindo e canalizando energia para manter-se no estado estacionário dinâmico longe do equilíbrio. Energia é obtida do sol ou de combustíveis químicos pela conversão da energia do fluxo de elétrons em ligações químicas no ATP.
- A tendência de uma reação química em prosseguir em direção ao equilíbrio pode ser expressa como função da energia livre, $\Delta G$, que tem dois componentes: a variação da entalpia, $\Delta H$, e a variação da entropia, $\Delta S$. Essas variáveis estão relacionadas pela equação $\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S$.
- Quando o $\Delta G$ de uma reação é negativo, a reação é exergônica e tende a caminhar para sua conclusão; quando $\Delta G$ é positivo, a reação é endergônica e tende a ir na direção oposta. Quando duas reações podem ser somadas para produzir uma terceira, o $\Delta G$ da reação global é a soma dos $\Delta G$s das duas reações separadas.
- As reações que convertem ATP em $P_i$ e ADP ou em AMP e $PP_i$ são altamente exergônicas ($\Delta G$ negativo e grande em módulo). Muitas reações celulares endergônicas são propulsionadas pelo seu acoplamento, mediante um intermediário comum, àquelas reações altamente exergônicas.
- A variação da energia livre padrão, $\Delta G°$, é uma constante física relacionada à constante de equilíbrio pela equação $\Delta G° = -RT \ln K_{eq}$.
- Muitas reações celulares ocorrem a velocidades apropriadas somente porque as enzimas estão presentes para catalisá-las. As enzimas atuam em parte pela estabilização do estado de transição, reduzindo a energia de ativação, $\Delta G^{\ddagger}$, e aumentando a velocidade de reação em várias ordens de grandeza. A atividade catalítica das enzimas nas células é regulada.
- Metabolismo é a soma de muitas sequências de reações interconectadas que interconvertem metabólitos celulares. Cada sequência é regulada para suprir o que a célula precisa em um dado momento e para gastar energia somente quando necessário.

## 1.4 Fundamentos genéticos

Talvez a propriedade mais marcante dos organismos e das células vivas seja sua capacidade de se reproduzir por incontáveis gerações com fidelidade quase perfeita. Essa continuidade de traços herdados sugere constância, ao longo de milhões de anos, na estrutura das moléculas que contêm a informação genética. Poucos registros históricos de civilizações sobreviveram por mil anos mesmo quando riscados em superfícies de cobre ou talhados em pedra (**Figura 1-30**). Contudo, existem boas evidências de que as instruções genéticas permaneceram praticamente intactas nos organismos vivos por períodos muito maiores; muitas bactérias têm praticamente o mesmo tamanho, forma e estrutura interna, apresentando também o mesmo tipo de moléculas precursoras e enzimas das bactérias que viveram cerca de quatro bilhões de anos atrás. Essa continuidade da estrutura e da composição é o resultado da continuidade da estrutura do material genético.

Entre as descobertas mais notáveis da biologia no século XX está a natureza química e a estrutura tridimensional do material genético, **ácido desoxirribonucleico**, **DNA**. A sequência de subunidades monoméricas, os nucleotídeos (estritamente, desoxirribonucleotídeos, como discutido a seguir), neste polímero linear codifica as instruções para formar todos os outros componentes celulares e fornece o molde para a produção de moléculas de DNA idênticas a serem distribuídas aos descendentes por ocasião da divisão celular. A perpetuação de uma espécie biológica requer que sua informação genética seja mantida de modo estável, expressa com exatidão na forma de produtos dos genes e reproduzida com o mínimo de erros. O armazenamento, a expressão e a reprodução efetivos da mensagem genética definem espécies individuais, distinguem umas das outras e asseguram a sua continuidade em sucessivas gerações.

### A continuidade genética está contida em uma única molécula de DNA

O DNA é um polímero orgânico, fino e longo; a rara molécula que é construída na escala atômica em uma dimensão (largura) na escala humana em outra (comprimento: uma molécula de DNA pode ter vários centímetros de comprimento). Um esperma ou óvulo humano, carregando a informação hereditária acumulada em bilhões de anos de evolução, transmite essa herança na forma de moléculas de DNA, nas quais a sequência linear de subunidades de nucleotídeos ligados covalentemente codifica a mensagem genética.

Normalmente quando são descritas as propriedades de espécies químicas, é descrito o comportamento médio de um número muito grande de moléculas idênticas. Embora seja difícil prever o comportamento de uma única molécula em uma população, por exemplo, de um

(a) (b)

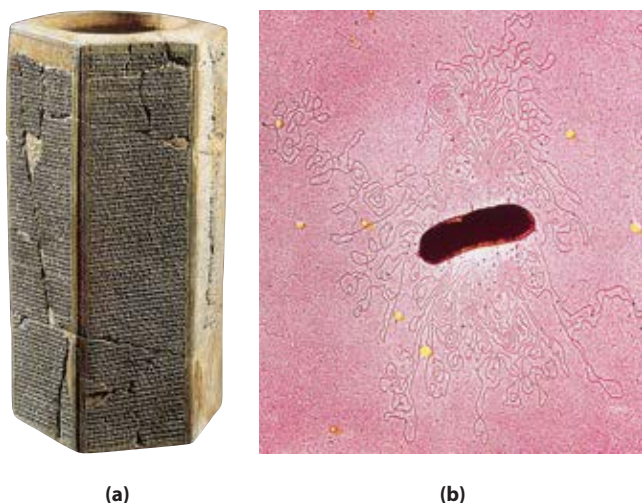



**FIGURA 1-30 Duas inscrições antigas. (a)** O Prisma de Sennacherib, inscrito em torno de 700 a.C., descreve em caracteres da linguagem assíria alguns eventos históricos durante o reinado do Rei Sennacherib. O prisma contém cerca de 20.000 caracteres, pesa cerca de 50 kg e sobreviveu de forma quase intacta por 2.700 anos. **(b)** Uma única molécula de DNA da bactéria *E. coli*, extravasando de uma célula rompida, é centenas de vezes mais longa que a própria célula e contém codificada toda a informação necessária para especificar a estrutura e a função da célula. O DNA bacteriano contém cerca de 4,6 milhões de caracteres (nucleotídeos), pesa menos do que $10^{-10}$ g e sofreu somente algumas pequenas alterações durante os últimos milhões de anos (as manchas amarelas e os pontos escuros nesta micrografia eletrônica colorida são artefatos da preparação).

picomol de compostos (cerca de $6 \times 10^{11}$ moléculas), o comportamento *médio* das moléculas é previsível porque muitas delas entram no cálculo da média. O DNA celular é uma notável exceção. O DNA que forma todo o material genético da *E. coli* é uma *única molécula* contendo 4,64 milhões de pares de nucleotídeos. Essa única molécula tem de ser replicada com perfeição nos mínimos detalhes para que uma célula de *E. coli* possa gerar descendentes idênticos por divisão celular; não existe espaço para tomar médias nesse processo! O mesmo vale para todas as células. O esperma humano traz para o óvulo que ele fertiliza somente uma molécula de DNA de cada um dos 23 cromossomos, para se combinar com somente uma molécula de cada cromossomo correspondente no óvulo. O resultado dessa união é altamente previsível: um embrião com todos os seus ~25.000 genes, feitos de 3 bilhões de pares de nucleotídeos, intactos. Um feito químico impressionante!

**PROBLEMA RESOLVIDO 1-6** **Fidelidade da replicação do DNA**

Calcule o número de vezes que o DNA de uma célula de *E. coli* atual foi copiado desde que sua primeira célula bacteriana precursora surgiu há cerca de 3,5 bilhões de anos. Para simplificar, assuma que neste período a *E. coli* sofreu, em média, uma divisão celular a cada 12 horas (isto é superestimado para a bactéria atual, mas provavelmente subestimado para a bactéria ancestral).

**Solução:**

$$(1 \text{ geração/12h})\ (24 \text{ h/dia})\ (365 \text{ dias/ano})\ (3{,}5 \times 10^9 \text{ anos}) = 2{,}6 \times 10^{12} \text{ gerações}$$

Uma única página deste livro contém cerca de 5.000 caracteres, de tal forma que o livro inteiro contém 5 milhões de caracteres. O cromossomo da *E. coli* também contém 5 milhões de caracteres (pares de nucleotídeos). Se você fizer uma cópia manual deste livro e, então, passá-lo a um colega de classe para também fazer uma cópia manual, e se essa cópia for passada para um terceiro colega de classe para fazer a terceira cópia da cópia e assim por diante, quanto cada cópia vai se assemelhar com o livro original? Agora, imagine o texto que resultaria ao se fazer cópias de cópias à mão alguns trilhões de vezes!

## A estrutura do DNA permite sua replicação e seu reparo com fidelidade quase perfeita

A capacidade dos seres vivos de preservar seu material genético e duplicá-lo para a próxima geração resulta da complementaridade entre as duas fitas da molécula de DNA (**Figura 1-31**). A unidade básica do DNA é um polímero linear de quatro subunidades monoméricas diferentes, **desoxirribonucleotídeos**, arranjados em uma sequência linear precisa. Essa sequência linear codifica a informação genética. Duas dessas fitas poliméricas estão torcidas uma em torno da outra formando a dupla-hélice de DNA, na qual cada desoxirribonucleotídeo em uma fita pareia especificamente com um desoxirribonucleotídeo complementar na fita oposta. Antes de a célula se dividir, as duas fitas de DNA se separam uma da outra e cada uma serve de molde para a síntese de uma nova fita complementar, gerando duas moléculas em forma de dupla-hélice idênticas, uma para cada célula-filha. Se qualquer uma das fitas é danificada, então a continuidade da informação é assegurada pela informação presente na fita oposta, que pode atuar como molde para reparar o dano.

## A sequência linear no DNA codifica proteínas com estrutura tridimensional

A informação no DNA é codificada na sequência linear (unidimensional) de subunidades de desoxirribonucleotídeos, mas a expressão dessa informação resulta em uma célula tridimensional. Essa transformação da informação de uma dimensão para três dimensões ocorre em duas fases. Uma sequência linear de desoxirribonucleotídeos no DNA codifica (por meio de um intermediário, RNA) a produção de uma proteína com a sequência linear de aminoácidos correspondente (**Figura 1-32**). A proteína é enovelada em uma forma tridimensional particular determinada pela sua sequência de aminoácidos e estabilizada principalmente por interações não covalentes. Embora a forma final da proteína enovelada seja ditada pela sua sequência de aminoácidos, o processo de enovelamento é assistido por "chaperonas moleculares" (ver Figura 4-30). A

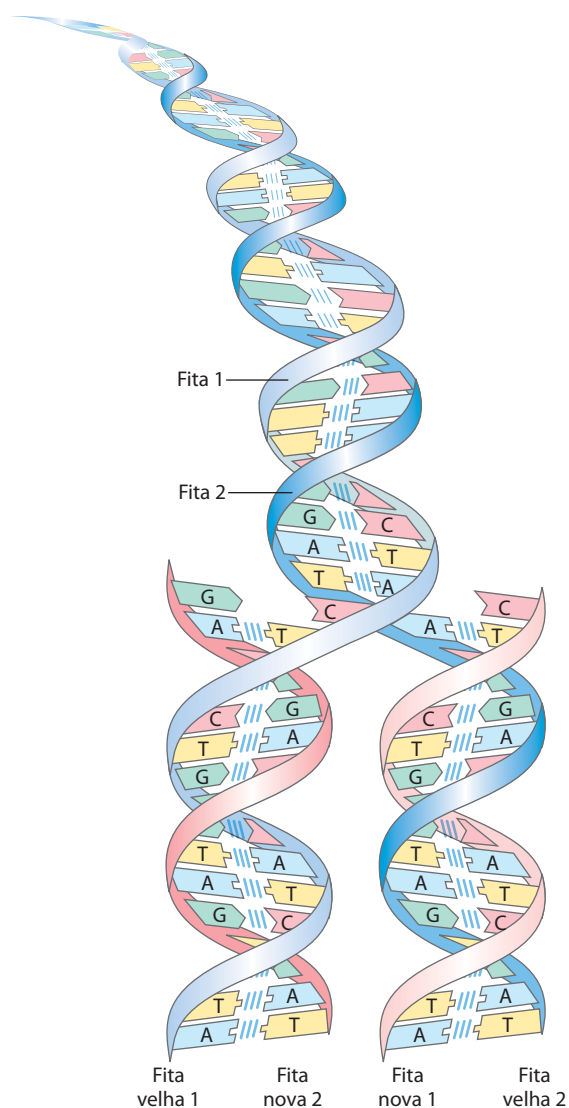



**FIGURA 1-31 Complementaridade entre as duas fitas de DNA.** O DNA é um polímero linear de quatro tipos de desoxirribonucleotídeos, ligados covalentemente: desoxiadenilato (A), desoxiguanilato (G), desoxicitidilato (C), desoxitimidilato (T). Cada nucleotídeo, com sua estrutura tridimensional única, pode se associar especificamente, mas não covalentemente, com outro nucleotídeo na fita complementar: A sempre se associa com T e G com C. Portanto, na molécula de DNA fita dupla, toda a sequência de nucleotídeos em uma das fitas é complementar à sequência da outra. As duas fitas, mantidas juntas por ligações de hidrogênio (representado por traços verticais em azul-claro) entre cada par de nucleotídeos complementar, giram uma em torno da outra para formar a dupla-hélice de DNA. Na replicação do DNA, as duas fitas (em azul) se separam e duas fitas novas (em cor-de-rosa) são sintetizadas, cada qual com uma sequência complementar às fitas originais. O resultado são duas moléculas tipo dupla-hélice e cada uma idêntica ao DNA original.

**FIGURA 1-32 Do DNA ao RNA, do RNA à proteína e da proteína à enzima (hexocinase).** A sequência linear de desoxirribonucleotídeos no DNA (o gene), que codifica a proteína hexocinase, é primeiro transcrita em uma molécula de ácido ribonucleico (RNA) com uma sequência complementar de ribonucleotídeos. A sequência do RNA (RNA mensageiro) é então traduzida na cadeia linear da proteína hexocinase, que então se dobra na sua forma nativa tridimensional com o auxílio das chaperonas moleculares. Uma vez em sua forma nativa, a hexocinase adquire sua atividade catalítica: ela catalisa a fosforilação da glicose, usando ATP como doador do grupo fosforila.

estrutura tridimensional precisa ou **conformação nativa** de uma proteína é crucial para sua função.

Uma vez em sua conformação nativa, a proteína pode associar-se não covalentemente com outras macromoléculas (outras proteínas, ácidos nucleicos ou lipídeos) para formar complexos supramoleculares, como cromossomos, ribossomos e membranas. As moléculas individuais desses complexos têm sítios de ligação para cada uma com alta afinidade específica, e dentro das células elas se agrupam espontaneamente em complexos funcionais.

Apesar de as sequências de aminoácidos das proteínas carregarem toda a informação necessária para alcançar a conformação nativa da proteína, o enovelamento preciso e a automontagem também requerem o ambiente celular correto – pH, força iônica, concentrações de íons metálicos, e assim por diante. Portanto, a sequência de DNA sozinha não é suficiente para formar e manter uma célula completamente funcional.

## RESUMO 1.4 Fundamentos genéticos

- A informação genética é codificada na sequência linear de quatro tipos de desoxirribonucleotídeos no DNA.
- A dupla-hélice da molécula de DNA contém um molde interno para sua própria replicação e reparo.

- Moléculas de DNA são extremamente grandes, com massas moleculares de milhões ou bilhões.
- Apesar do tamanho enorme do DNA, a sequência de nucleotídeos nela é muito precisa, e a manutenção dessa precisão no decorrer de períodos bem longos de tempo é a base da continuidade genética dos organismos.
- A sequência linear de aminoácidos em uma proteína, que está codificada no DNA do gene dessa proteína, produz a estrutura tridimensional específica da proteína – processo que também depende das condições ambientais.
- Macromoléculas individuais com afinidade específica por outras macromoléculas têm a capacidade de se auto-organizar em complexos supramoleculares.

## 1.5 Fundamentos evolutivos

Nada na biologia faz sentido exceto sob a luz da evolução.

— Theodosius Dobzhansky, *The American Biology Teacher*, março de 1973

O grande progresso na bioquímica e na biologia molecular nas últimas décadas confirmou a validade da contundente generalização de Dobzhansky. A notável semelhança das rotas metabólicas e das sequências de genes entre os três grupos da vida sugere fortemente que todos os organismos modernos derivaram de um ancestral evolutivo comum por meio de uma série de pequenas mudanças (mutações), cada uma conferindo uma vantagem seletiva a algum organismo em algum nicho ecológico.

### Mudanças nas instruções hereditárias possibilitam a evolução

Apesar da fidelidade quase perfeita na replicação genética, erros pouco frequentes não reparados no processo de replicação do DNA levam a mudanças na sequência de nucleotídeos do DNA, produzindo uma **mutação** genética e alterando as instruções para um componente celular. Danos reparados incorretamente em uma das fitas do DNA possuem o mesmo efeito. Mutações no DNA passadas aos descendentes – isto é, mutações presentes nas células reprodutivas – podem ser danosas ou mesmo letais ao novo organismo ou célula; elas podem, por exemplo, ser a causa da síntese de uma enzima defeituosa incapaz de catalisar uma reação metabólica essencial. Ocasionalmente, contudo, uma mutação equipa *melhor* um organismo ou uma célula para sobreviver em um dado ambiente (**Figura 1-33**). Uma enzima mutante pode ter adquirido, por exemplo, uma especificidade um pouco diferente que a torna agora capaz de usar um composto que previamente a célula estava incapacitada de metabolizar. Se uma população de células estiver em um ambiente onde aquele composto é a única ou a mais abundante fonte de combustível disponível, então a célula mutante terá vantagem competitiva sobre as célu-

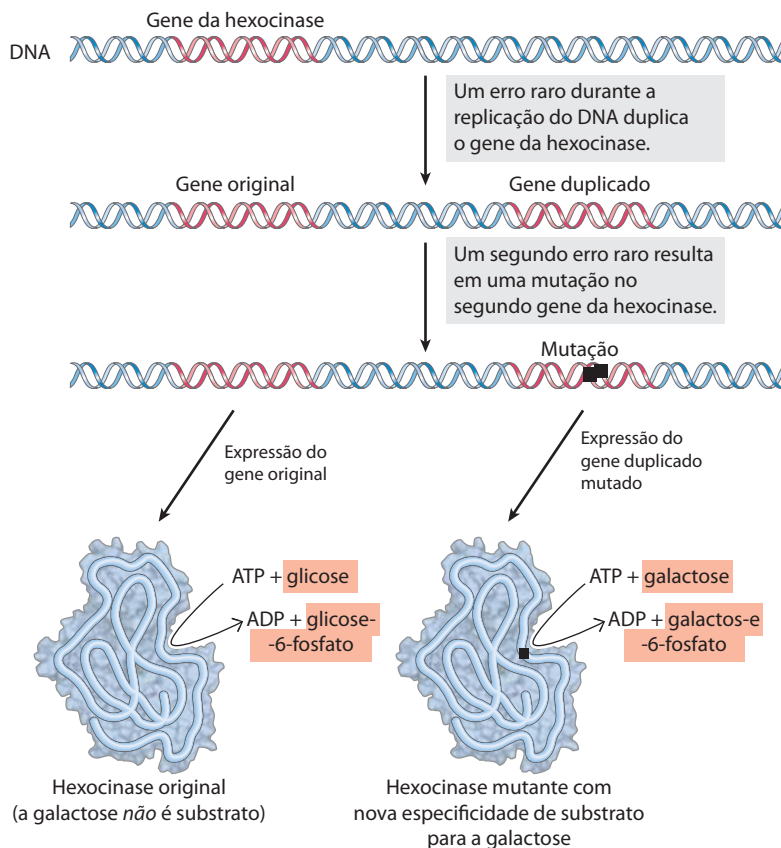



**FIGURA 1-33 Duplicação e mutação de genes: um caminho para gerar novas atividades enzimáticas.** Neste exemplo, o único gene da hexocinase em um organismo hipotético pode acabar acidentalmente copiado duas vezes durante a replicação do DNA, de modo que o organismo tenha duas cópias inteiras do gene, uma delas desnecessária. Ao longo de gerações, à medida que o DNA com dois genes para a hexocinase é repetidamente replicado, alguns erros raros podem ocorrer, levando a mudanças na sequência de nucleotídeos do gene excedente e, portanto, da proteína que ele codifica. Em alguns casos muito raros, a proteína produzida a partir desse gene mutado é alterada de tal forma que ela se liga a um novo substrato – galactose neste caso hipotético. A célula contendo o gene mutante adquire uma nova capacidade (metabolizar a galactose), permitindo-lhe que sobreviva em um nicho ecológico que dispõe de galactose, mas não de glicose. Se a mutação ocorrer sem a duplicação do gene, então a função original do produto do gene é perdida.

las não mutadas (**tipo selvagem**) da população. A célula mutada e suas descendentes vão sobreviver e prosperar no novo ambiente, enquanto as células do tipo selvagem vão definhar e ser eliminadas. Isso é o que Darwin denominou de seleção natural – o que muitas vezes é resumido como "sobrevivência do mais adaptado".

Ocasionalmente, uma segunda cópia de um gene inteiro é introduzida em um cromossomo como resultado da replicação defeituosa do cromossomo. A segunda cópia é desnecessária, e mutações nesse gene não serão deletérias, podendo se tornar um meio pelo qual a célula pode evoluir, produzindo um novo gene com uma nova função enquanto mantém o gene original e a sua função. Sob essa óptica, as moléculas de DNA dos organismos modernos são documentos históricos, registros de uma longa jornada desde as primeiras células até os organismos modernos. Contudo, os registros históricos no DNA não estão completos; no curso da evolução, muitas mutações devem ter sido apagadas ou reescritas. Contudo, as moléculas de DNA são a melhor fonte de história biológica disponível. A frequência de erros na replicação do DNA representa um equilíbrio entre muitos erros, os quais gerariam células-filhas inviáveis, e relativamente poucos, que impediriam a variação genética que permite a sobrevivência das células mutantes em novos nichos ecológicos.

Vários bilhões de anos de seleção natural acabaram refinando os sistemas celulares para tirar o máximo das propriedades físicas e químicas das matérias-primas disponíveis. As mutações genéticas ocasionais que ocorreram em indivíduos de uma população, combinadas com a seleção natural, resultaram na evolução para essa enorme variedade de espécies observadas atualmente, cada uma adaptada ao seu nicho ecológico particular.

## As biomoléculas surgiram primeiro por evolução química

Até aqui foi omitido o primeiro capítulo da história da evolução: o surgimento da primeira célula viva. Os compostos orgânicos, incluindo as biomoléculas básicas como aminoácidos e carboidratos, são encontrados, se não for considerada sua ocorrência nos organismos vivos, na crosta terrestre, no mar e na atmosfera somente na quantidade de pequenos traços. Então como o primeiro organismo vivo conseguiu adquirir seus blocos de construção orgânica característicos? De acordo com uma hipótese, esses compostos foram criados pelo efeito de poderosas forças ambientais – irradiação ultravioleta, relâmpagos e raios ou erupções vulcânicas – sobre os gases da atmosfera terrestre prebiótica e sobre os solutos inorgânicos nas fontes hidrotermais superaquecidas nas profundezas do oceano.

Essa hipótese foi testada em um experimento clássico sobre a origem abiótica (não biológica) de biomoléculas orgânicas conduzido em 1953 por Stanley Miller no laboratório de Harold Urey. Miller submeteu uma mistura de gases supostamente existentes na terra prebiótica, incluindo $NH_3$, $CH_4$, $H_2O$ e $H_2$, a uma descarga elétrica produzida por um par de eletrodos (para simular relâmpagos e raios) por um período de uma semana ou mais e então analisou o conteúdo do frasco da reação fechada (**Figura 1-34**). A fase gasosa da mistura continha CO e $CO_2$, além dos gases de partida. A fase líquida continha uma grande variedade de compostos orgânicos, incluindo alguns aminoácidos, ácidos orgânicos, aldeídos e ácido cianídrico (HCN). Esse experimento mostrou a possibilidade da produção abiótica de biomoléculas em um tempo relativamente curto e em condições relativamente brandas. Quando as amostras de

(b)

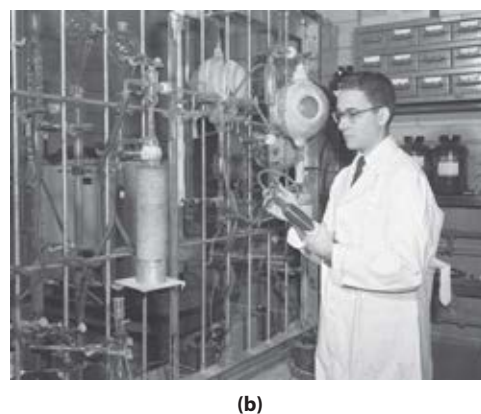
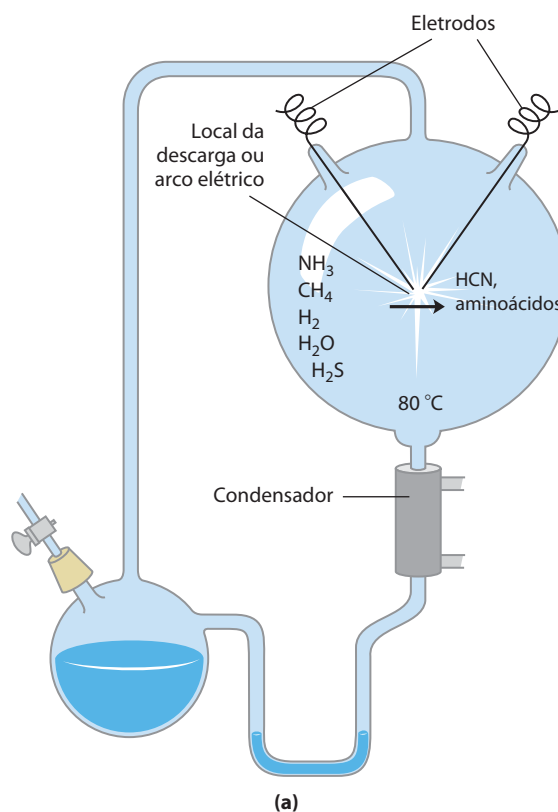



**FIGURA 1-34 Produção abiótica de biomoléculas. (a)** Aparelho de descargas elétricas usado por Miller e Urey em experimentos demonstrando a formação abiótica de compostos orgânicos em condições atmosféricas primitivas. Após submeter a mistura gasosa do sistema a descargas elétricas, os produtos formados foram coletados por condensação. Biomoléculas como aminoácidos estavam entre esses produtos. **(b)** Stanley L. Miller (1930-2007) usando seu aparelho de descargas elétricas.

Miller cuidadosamente guardadas foram redescobertas em 2010 e examinadas com muito mais sensibilidade e técnicas com alto poder de resolução (cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas), suas observações originais foram confirmadas e ampliadas significativamente. Resultados previamente não publicados por Miller e que incluíram $H_2S$ na mistura gasosa (imitando as condições das atividades vulcânicas no fundo do mar; Figura 1-35) mostraram a formação de 23 aminoácidos e 7 compostos organossulfurados, bem como um grande número de outros compostos simples que podem ter servido como blocos de construção da evolução prebiótica.

Experimentos de laboratório mais refinados forneceram boas evidências de que muitos dos componentes químicos das células vivas, incluindo polipeptídeos e moléculas parecidas com o RNA, podem se formar sob essas condições. Polímeros de RNA podem atuar como catalisadores em reações biologicamente importantes (ver Capítulos 26 e 27), e o RNA provavelmente exerceu um papel crucial na evolução prebiótica, tanto como catalisador como repositório de informações.

## RNA ou precursores relacionados podem ter sido os primeiros genes e catalisadores

Nos organismos modernos, ácidos nucleicos codificam a informação genética que especifica a estrutura das enzimas, e as enzimas catalisam a replicação e o reparo dos ácidos nucleicos. A dependência mútua dessas duas classes de biomoléculas traz a intrigante pergunta: quem veio primeiro, DNA ou proteína?

A resposta pode ser que ambos surgiram aproximadamente ao mesmo tempo e que o RNA precedeu ambos. A descoberta de que moléculas de RNA podem atuar como catalisadoras da sua própria formação sugere que o RNA, ou uma molécula similar, pode ter sido o primeiro gene e o primeiro catalisador. De acordo com esse cenário (**Figura 1-36**), um dos primeiros estágios da evolução biológica foi a formação por acaso de uma molécula de RNA que pôde catalisar a formação de outra molécula de RNA com a mesma sequência – uma autorreplicação, um RNA autoperpetuante. A concentração de uma molécula de RNA autorreplicante cresceria exponencialmente, visto que uma molécula formou várias, várias formaram muitas mais, e assim por diante. A fidelidade da autorreplicação presumivelmente não era perfeita, de modo que o processo gerou variantes do RNA, muitos dos quais podendo ser melhores para a autorreplicação. Na competição por nucleotídeos, a mais eficiente entre as sequências autorreplicantes ganharia e os replicadores menos eficientes se extinguiriam da população.

**FIGURA 1-35 Colunas quentes contendo material escuro.** Fontes termais no leito do oceano emitem água superaquecida e rica em minerais dissolvidos. A coluna escura é formada quando o jato superaquecido encontra a água fria do oceano, causando a precipitação dos sulfitos dissolvidos. Diversas formas de vida, incluindo arqueias e alguns animais multicelulares surpreendentemente complexos, são encontradas nas vizinhanças de tais termas, que podem ter sido os sítios da biogênese inicial.

**FIGURA 1-36 Possível roteiro para o "mundo do RNA".**

A divisão de tarefas entre DNA (depósito de informação genética) e proteína (catálise) foi, de acordo com a hipótese do "mundo do RNA", um desenvolvimento posterior. Novas variantes de moléculas de RNA autorreplicantes se desenvolveram, com a capacidade adicional de catalisar a condensação de aminoácidos em peptídeos. Eventualmente, os peptídeos assim formados puderam reforçar a capacidade do RNA de se autorreplicar, e o par – molécula de RNA e peptídeo auxiliar – poderia passar por modificações adicionais na sequência, gerando sistemas autorreplicantes com eficiência crescente. A interessante descoberta de que na maquinaria de síntese de proteínas nas células modernas (ribossomos) são as moléculas de RNA, e não as proteínas, que catalisam a formação das ligações peptídicas é consistente com a hipótese do mundo do RNA.

Algum tempo após a evolução desse sistema primitivo de síntese de proteínas, houve um desenvolvimento adicional: moléculas de DNA com sequências complementares às moléculas de RNA autorreplicantes assumiram a função de conservar a informação "genética", e as moléculas de RNA evoluíram para exercer o seu papel na síntese de proteínas. (Será explicado no Capítulo 8 por que o DNA é uma molécula mais estável que o RNA e, portanto, um repositório mais adequado à informação hereditária.) As proteínas se revelaram catalisadores versáteis e, com o passar do tempo, assumiram a maior parte dessa função. Compostos semelhantes a lipídeos presentes na mistura primordial formaram camadas relativamente impermeáveis ao redor das coleções de moléculas autorreplicantes. A concentração de proteínas e ácidos nucleicos dentro desses invólucros lipídicos favoreceu as interações moleculares necessárias para a autorreplicação.

O cenário do mundo de RNA é intelectualmente satisfatório, mas ele deixa uma questão sem resposta: de onde vieram os nucleotídeos necessários para fazer o RNA inicial? Uma alternativa ao cenário de um mundo de RNA supõe que rotas metabólicas simples evoluíram primeiro, talvez nas fontes termais do leito do oceano. Um conjunto de reações químicas inter-relacionadas nesses locais pode ter produzido os precursores, antes do advento das membranas de lipídeos ou RNA. Sem maiores evidências experimentais, nenhuma dessas hipóteses pode ser desconsiderada.

## A evolução biológica começou há mais de três bilhões e meio de anos

A Terra se formou há cerca de 4,6 bilhões de anos, e a primeira evidência de vida data de mais de 3,5 bilhões de anos atrás. Em 1996, cientistas trabalhando na Groenlândia encontraram evidências químicas de vida ("moléculas fósseis") tão antigas quanto 3,85 bilhões de anos, formas de carbono incrustadas em rochas que parecem ter uma origem nitidamente biológica. Em algum lugar da Terra, durante seus primeiros bilhões de anos, os primeiros organismos surgiram, capazes de replicar sua própria estrutura a partir de um molde (RNA?), que foi o primeiro material genético. Considerando que a atmosfera terrestre no alvorecer da vida estava praticamente desprovida de oxigênio e que existiam poucos microrganismos para decompor os compostos orgânicos formados pelos processos naturais, então esses compostos eram relativamente estáveis. Dada essa estabilidade e a eternidade de tempo transcorrido, o improvável se tornou inevitável: vesículas lipídicas contendo compostos orgânicos e RNA autorreplicante deram origem às primeiras células (protocélulas), e essas protocélulas com maior capacidade de autorreplicação se tornaram mais numerosas. Assim, teve início o processo da evolução biológica.

## A primeira célula provavelmente usou combustíveis inorgânicos

As células primitivas surgiram em uma atmosfera redutora (não existia oxigênio) e provavelmente obtiveram energia de compostos inorgânicos, como sulfeto ferroso e carbonato ferroso, ambos abundantes na superfície terrestre. Por exemplo, a reação

$$FeS + H_2S \longrightarrow FeS_2 + H_2$$

produz energia suficiente para promover a síntese de ATP ou compostos semelhantes. Os compostos orgânicos de que essas células primitivas precisavam podem ter surgido das ações não biológicas de raios e relâmpagos, do calor dos vulcões ou do calor de fontes termais no leito do oceano sobre os componentes da atmosfera primitiva, como CO, $CO_2$, $N_2$, $NH_3$, $CH_4$ e outros. Uma fonte alternativa de compostos orgânicos tem sido proposta: o espaço extraterrestre. Em 2006, a missão espacial Stardust (poeira estelar) trouxe finas partículas de poeira da cauda de um cometa; a poeira continha uma variedade de compostos orgânicos, inclusive o aminoácido simples glicina.

Os organismos unicelulares primitivos adquiriram gradualmente a capacidade de extrair energia de compostos do seu meio e de usar esta energia para sintetizar a maioria de suas moléculas precursoras, tornando-se, portanto, menos dependentes de fontes externas. Um evento evolutivo muito significante foi o desenvolvimento de pigmentos capazes de capturar a energia da luz do sol, que pode ser usada para reduzir, ou "fixar", $CO_2$ para formar compostos orgânicos mais complexos. O doador original de elétrons para estes processos **fotossintéticos** foi provavelmente o $H_2S$, produzindo enxofre elementar ou sulfato como subproduto; mais tarde, as células desenvolveram a capacidade enzimática de usar $H_2O$ como doador de elétrons nas reações fotossintéticas, produzindo $O_2$ como resíduo. As cianobactérias são os descendentes modernos desses primeiros produtores de oxigênio fotossintético.

Pelo fato de a atmosfera da Terra nos estágios iniciais da evolução biológica estar praticamente desprovida de oxigênio, as primeiras células eram anaeróbias. Sob tais condições, organismos quimiotróficos podiam oxidar compostos orgânicos em $CO_2$ passando elétrons não para o $O_2$, mas para aceptores que produzem $H_2S$ como produto. Com o surgimento de bactérias fotossintéticas produtoras de $O_2$, a atmosfera se tornou progressivamente rica em oxigênio – oxidante poderoso e tóxico para organismos anaeróbios. Respondendo à pressão evolutiva ao que Lynn Margulis e Dorion Sagan chamaram de "holocausto do oxigênio", algumas linhagens de microrganismos levaram ao surgimento de organismos aeróbios que obtêm energia passando elétrons das moléculas de combustível ao oxigênio. Devido ao

fato de a transferência de elétrons de moléculas orgânicas ao $O_2$ liberar uma grande quantidade de energia, os organismos aeróbios tiveram uma vantagem energética sobre seus equivalentes anaeróbios quando ambos competiam no ambiente contendo oxigênio. Essa vantagem se traduziu na predominância de organismos aeróbios em ambientes ricos em $O_2$.

As bactérias e as arqueias modernas habitam praticamente todos os nichos ecológicos da biosfera, e existem organismos capazes de usar praticamente qualquer tipo de composto orgânico como fonte de carbono e energia. Microrganismos fotossintéticos, tanto em água salgada como em água doce, captam energia solar e a utilizam para gerar carboidratos e todos os outros constituintes da célula, que por sua vez são usados como alimento pelas outras formas de vida. O processo de evolução continua – e inclusive pode ser observado em laboratório com células bacterianas que se reproduzem muito rapidamente. Uma linha interessante de pesquisa para estudar os mecanismos evolucionários consiste em tentar produzir bactérias sintéticas no laboratório (no qual o experimentador providencia cada componente purificado por conhecimento prévio). O primeiro passo nessa direção consiste em determinar o número mínimo de genes necessários para a vida examinando o genoma da bactéria mais simples. O menor genoma conhecido de uma bactéria de vida livre é de *Mycobacterium genitalium*, que contém 580.000 pares de bases codificando 483 genes. Em 2010, cientistas do Instituto Craig Venter conseguiram sintetizar *in vitro* o cromossomo da bactéria, e então incorporaram o cromossomo sintético em uma bactéria viva de outra espécie, que por sua vez adquiriu as propriedades de *Mycobacterium genitalium.* Essa tecnologia abre caminho para a produção de uma grande variedade de células sintéticas, com o mínimo básico de genes essenciais para a vida. Com uma célula dessas, pode-se esperar o estudo em laboratório do processo evolucionário pelo qual as protocélulas gradualmente se diversificaram e se tornaram mais complexas.

**FIGURA 1-37** **Marcos da evolução da vida na Terra.**

## Células eucarióticas evoluíram a partir de precursores mais simples por meio de vários estágios

A partir de 1,5 bilhão de anos atrás, os registros fósseis começaram a mostrar evidências de organismos maiores e mais complexos, provavelmente as primeiras células eucarióticas (**Figura 1-37**). Detalhes do caminho evolutivo de células não nucleadas para células nucleadas não podem ser deduzidos somente pelo registro fóssil, mas as semelhanças bioquímicas e morfológicas dos organismos modernos sugerem uma sequência de eventos consistente com a evidência fóssil.

Três mudanças principais devem ter ocorrido. Primeiro, à medida que as células adquiriram mais DNA, os mecanismos necessários para o enrolamento compacto em torno de proteínas específicas formando complexos separados, mantendo a capacidade de promover a divisão correta entre as células-filhas, tornaram-se mais elaborados. Proteínas especializadas foram necessárias para estabilizar o DNA enrolado e para separar os complexos DNA-proteína resultantes (cromossomos) durante a divisão celular. Segundo, à medida que as células se tornaram maiores, um sistema de membranas intracelular se desenvolveu, incluindo uma dupla membrana envolvendo o DNA. Essa membrana segregou o processo nuclear de síntese de RNA a partir do molde de DNA do processo citoplasmático de síntese de proteínas nos ribossomos. Finalmente, de acordo com a hipótese agora amplamente aceita (mas que teve muita resistência no início) adiantada por Lynn Margulis, as primeiras células eucarióticas, que eram incapazes de realizar fotossíntese ou metabolismo aeróbio, englobaram bactérias aeróbias e bactérias fotossintéticas, formando associações **endossimbióticas** que finalmente se tornaram permanentes (**Figura 1-38**). Algumas bactérias aeróbias evoluíram para as mitocôndrias dos eucariotos modernos, e algumas cianobactérias fotossintéticas se tornaram os plastídeos, como os cloroplastos das algas verdes, os prováveis ancestrais das células das plantas modernas.

Lynn Margulis, 1938-2011

**FIGURA 1-38 Evolução dos eucariotos por endossimbiose.** O eucarioto primitivo, um anaeróbio, adquiriu uma bactéria púrpura endossimbiótica (em amarelo), que levou consigo a capacidade de fazer o catabolismo aeróbio e se tornou, com o tempo, a mitocôndria. Quando a cianobactéria fotossintética (em verde) se tornou endossimbionte de alguns eucariotos aeróbios, então essas células se tornaram os precursores fotossintéticos das modernas plantas e das algas verdes.

Em algum estágio posterior da evolução, os organismos unicelulares acharam vantajoso se agregar como aglomerados, adquirindo assim maior mobilidade, eficiência ou sucesso reprodutivo se comparados com seus competidores unicelulares livres. Uma evolução adicional desses organismos agregados levou a associações permanentes entre células individuais e, por fim, à especialização dentro da colônia – isto é, à diferenciação celular.

As vantagens da especialização celular levaram à evolução de organismos sempre mais complexos e altamente diferenciados, nos quais algumas células realizavam as funções sensoriais, outras as funções digestivas, outras as fotossintéticas ou reprodutivas, e assim por diante. Muitos organismos multicelulares modernos contêm centenas de tipos de células diferentes, cada qual especializada para uma função de manutenção do organismo inteiro. Mecanismos fundamentais que evoluíram primeiramente tiveram ainda refinamentos ulteriores e se embelezaram com a evolução. Os mesmos mecanismos e estruturas básicas que sustentam o movimento dos cílios no *Paramecium* e do flagelo na *Chlamydomonas* são utilizados, por exemplo, pelos espermatozoides altamente diferenciados dos vertebrados.

## A anatomia molecular revela relações evolutivas

Agora os bioquímicos têm um tesouro de informações muito rico e sempre crescente sobre a anatomia molecular das células, que pode ser usado para analisar as relações evolutivas e refinar a teoria da evolução. A sequência do **genoma**, o conteúdo genético completo de um organismo, foi determinada para centenas de bactérias, para mais de 40 arqueias e para um número crescente de microrganismos eucarióticos, incluindo *Saccharomyces cerevisiae* e espécies de *Plasmodium*; plantas, incluindo *Arabidopsis thaliana* e arroz; e animais multicelulares, incluindo *Caenorhabditis elegans* (um verme), *Drosophila melanogaster* (a mosca-das-frutas), camundongo, rato, cachorro, chimpanzé e *Homo sapiens* (Tabela 1-2). Com tais sequências em mãos, uma comparação detalhada e quantitativa entre as espécies pode fornecer uma visão profunda do processo evolutivo. Até aqui, a filogenia molecular derivada da sequência de genes é consistente, mas em alguns casos é até mais precisa que a filogenia clássica com base em estruturas macroscópicas. Apesar de os organismos terem continuamente divergido em sua anatomia bruta, em nível molecular a unidade da vida se torna imediatamente clara; estruturas e mecanismos moleculares são muito semelhantes desde os organismos mais simples aos mais complexos. Essas semelhanças são mais facilmente percebidas nas sequências, tanto nas sequências de DNA que codificam proteínas como na própria sequência das proteínas.

Quando dois genes compartilham semelhanças de sequência facilmente detectáveis (sequência de nucleotídeos no DNA ou sequência de aminoácidos na proteína que eles codificam), suas sequências são ditas homólogas e as pro-

**TABELA 1-2** Alguns dos muitos organismos cujos genomas foram completamente sequenciados

| Organismo | Tamanho do genoma (pares de nucleotídeos) | Interesse biológico |
|---|---|---|
| *Mycoplasma genitalium* | $5,8 \times 10^5$ | O menor organismo |
| *Helicobacter pylori* | $1,6 \times 10^6$ | Causa úlcera gástrica |
| *Methanocaldococcus jannaschii* | $1,7 \times 10^6$ | Arqueia; cresce a 85°C |
| *Haemophilus influenzae* | $1,9 \times 10^6$ | Causa gripe bacteriana |
| Synechocystis sp. | $3,9 \times 10^6$ | Cianobactéria |
| *Bacillus subtilis* | $4,2 \times 10^6$ | Bactéria comum do solo |
| *Escherichia coli* | $4,6 \times 10^6$ | Algumas linhagens são patógenos humanos |
| *Saccharomyces cerevisiae* | $1,2 \times 10^7$ | Eucarioto unicelular |
| *Caenorhabditis elegans* | $1,0 \times 10^8$ | Verme redondo multicelular |
| *Arabidopsis thaliana* | $1,2 \times 10^8$ | Planta modelo |
| *Drosophila melanogaster* | $1,8 \times 10^8$ | Mosca de laboratório ("mosca-da-fruta") |
| *Mus musculus* | $2,7 \times 10^9$ | Camundongo de laboratório |
| *Homo sapiens* | $3,0 \times 10^9$ | Humano |

**Fonte:** www.ncbi.nlm.nih.gov/genome.

teínas que eles codificam são **homólogas**. Se dois genes homólogos ocorrem na mesma espécie, então eles são ditos parálogos e os produtos proteicos também são **parálogos**. Presume-se que os genes parálogos sejam derivados da duplicação gênica, seguida por mudanças graduais nas sequências de ambas as cópias. Tipicamente, proteínas parálogas são semelhantes não somente em sequência, mas também em sua estrutura tridimensional, mas ambas adquiriram funções diferentes durante sua evolução.

Dois genes homólogos (ou proteínas) encontrados em espécies diferentes são ditos ortólogos e suas proteínas resultantes são **ortólogas**. Normalmente as ortólogas têm a mesma função em ambos os organismos; portanto, quando um novo gene sequenciado de uma espécie é fortemente ortólogo com um gene de outra espécie, então esse gene provavelmente codifica uma proteína com a mesma função em ambas as espécies. Dessa forma, a função do produto dos genes (proteínas ou moléculas de RNA) pode ser deduzida a partir da sequência genômica, sem nenhuma caracterização bioquímica das moléculas em si. Um **genoma anotado** tem, além da própria sequência de DNA, uma descrição da provável função do produto de cada gene, deduzida por comparação com outras sequências genômicas e funções proteicas estabelecidas. Às vezes, podem-se deduzir as capacidades metabólicas de um organismo somente pela sequência genômica, isto é, pela identificação das rotas (conjunto de enzimas) codificadas no genoma.

As diferenças entre as sequências de genes homólogos podem ser usadas como uma medida aproximada do distanciamento entre duas espécies no curso da evolução – ou há quanto tempo atrás o seu precursor evolutivo comum deu origem às duas linhas com destinos evolutivos diferentes. Quanto maior o número de sequências diferentes, mais antiga a divergência na história evolutiva. Pode-se construir uma filogenia (árvore genealógica) na qual a distância evolutiva entre duas espécies quaisquer é representada por sua proximidade na árvore (a Figura 1-4 é um exemplo).

No curso da evolução, novos processos, estruturas ou mecanismos regulatórios são adquiridos, reflexos dos genomas alterados dos organismos em evolução. O genoma de um eucarioto simples como a levedura deve ter genes relacionados à formação da sua membrana nuclear, genes esses não presentes nas bactérias ou nas arqueias. O genoma de um inseto deve conter genes que codificam proteínas envolvidas em especificar a segmentação característica do seu corpo, genes esses não presentes na levedura. O genoma de todos os vertebrados deve compartilhar genes que especificam o desenvolvimento da coluna vertebral, e o dos mamíferos deve ter genes próprios necessários para o desenvolvimento da placenta, uma característica dos mamíferos – e assim por diante. A comparação dos genomas completos das espécies de cada filo está levando à identificação de genes cruciais às mudanças evolutivas fundamentais no plano corporal e no desenvolvimento.

## A genômica funcional mostra a alocação de genes para processos celulares específicos

Quando a sequência de um genoma está completamente determinada e uma função é associada a cada gene, então os geneticistas moleculares podem agrupar os genes de acordo com o processo (síntese de DNA, síntese de proteína, geração de ATP, e assim por diante) no qual eles funcionam e também encontrar qual fração do genoma está

alocada para cada uma das atividades celulares. A maior categoria de genes em *E. coli*, *A. thaliana* e *H. sapiens* consiste em genes (até agora) de função desconhecida, o que representa mais de 40% dos genes de cada espécie. As proteínas de transporte que movem íons e pequenas moléculas através da membrana plasmática ocupam uma proporção significativa dos genes em todas as três espécies, mais em bactérias e plantas que nos mamíferos (10% dos ~4.400 genes de *E. coli*, ~8% dos ~32.000 genes de *A. thaliana*, e ~4% de ~25.000 genes de *H. sapiens*). Os genes que codificam as proteínas e o RNA necessários para síntese de proteínas somam de 3 a 4% do genoma de *E. coli*, mas nas células mais complexas de *A. thaliana*, mais genes são necessários para endereçar as proteínas até a sua localização final nas células do que o requerido para as sintetizar (cerca de 6 e 2% do genoma, respectivamente). Em geral, quanto mais complexo o organismo, maior a porção do seu genoma que codifica genes envolvidos na *regulação* de processos celulares e menor a porção dedicada aos processos básicos, como geração de ATP e síntese proteica.

## A comparação genômica apresenta importância crescente na biologia e na medicina humana

Os genomas de chimpanzés e humanos são 99,9% idênticos; mesmo assim, as diferenças entre as duas espécies são enormes. As poucas diferenças nos conteúdos genéticos devem explicar o domínio da linguagem em humanos, a extraordinária capacidade física dos chimpanzés e uma miríade de outras diferenças. A comparação de genomas está permitindo aos pesquisadores identificar genes candidatos conectados a divergências no programa de desenvolvimento de humanos e dos outros primatas e a emergência de funções complexas como a linguagem. Tudo se tornará mais claro somente quando o genoma de mais primatas se tornar disponível para comparação com o genoma humano.

Da mesma forma, as diferenças no conteúdo genético entre humanos são extremamente pequenas se comparadas com as diferenças entre humanos e chimpanzés. Mesmo assim, essas poucas diferenças são responsáveis pelas diferenças dentro da espécie humana – incluindo diferenças na saúde e na suscetibilidade a doenças crônicas. Há muito a aprender sobre a variabilidade na sequência entre humanos, e a disponibilidade dessa informação genômica vai certamente transformar o diagnóstico e o tratamento médico. Pode-se esperar que, para algumas doenças genéticas, os tratamentos paliativos até agora utilizados serão substituídos por curas. Pode-se esperar também que o alerta e a prevenção serão as medidas usadas quando suscetibilidades a doenças são detectadas por marcadores genéticos específicos. O atual "histórico médico" poderá ser substituído pelo "prognóstico médico". ■

### RESUMO 1.5 Fundamentos evolutivos

- Ocasionalmente, mutações herdadas geram organismos mais bem adaptados para sobreviver e, com a reprodução em um dado nicho ecológico, os seus descendentes passam a predominar na população desse nicho. Esse processo de mutação e seleção é a base da evolução darwiniana que vai da primeira célula a todos os organismos modernos. O grande número de genes compartilhados por todos os seres vivos explica suas semelhanças fundamentais.
- A vida surgiu há cerca de 3,5 bilhões de anos, mais provavelmente com a formação de um compartimento fechado por membrana contendo uma molécula de RNA autorreplicante. Os componentes das primeiras células podem ter sido produzidos perto de fontes termais no leito dos oceanos ou pela ação de raios e relâmpagos e altas temperaturas sobre moléculas atmosféricas simples, como $CO_2$ e $NH_3$.
- Os papéis catalíticos e genéticos exercidos pelos primeiros genomas de RNA foram ao longo do tempo sendo realizados por proteínas e DNA, respectivamente.
- Células eucarióticas adquiriram a capacidade de promover a fotossíntese e a fosforilação oxidativa a partir de bactérias endossimbióticas. Em organismos multicelulares, alguns tipos de células diferenciadas se especializaram em uma ou mais funções essenciais para a sobrevivência do organismo.
- O conhecimento das sequências completas de nucleotídeos dos genomas de organismos de diferentes ramos da árvore filogenética fornece compreensões mais profundas da evolução e oferece também grandes oportunidades para a medicina humana.

## Termos-chave

*Todos os termos estão definidos no glossário.*



## Leituras adicionais

### Geral

**Fruton, J.S.** (1999) *Proteins, Enzymes, Genes: The Interplay of Chemistry and Biochemistry,* Yale University Press, New Haven.

Destacado historiador da bioquímica relata o desenvolvimento dessa ciência e discute seus impactos na medicina, farmácia e agricultura.

**Harold, F.M.** (2001) *The Way of the Cell: Molecules, Organisms, and the Order of Life,* Oxford University Press, Oxford.

**Judson, H.F.** (1996) *The Eighth Day of Creation: The Makers of the Revolution in Biology,* expanded edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
Descrição muito clara e apropriada do surgimento da bioquímica e biologia molecular no século vinte.

**Kornberg, A.** (1987) The two cultures: chemistry and biology. *Biochemistry* **26**, 6888–6891.
A importância de aplicar ferramentas químicas aos problemas biológicos, descritos por um eminente especialista.

**Monod, J.** (1971) *Chance and Necessity,* Alfred A. Knopf, Inc., New York. (Paperback edition, Vintage Books, 1972.) Publicado originalmente (1970) com o título *Le hasard et la nécessité,* Editions du Seuil, Paris.
Exploração das implicações filosóficas do conhecimento biológico.

**Morowitz, H.J.** (2002) *The Emergence of Everything (How the World Became Complex),* Oxford University Press, Oxford.
Discussão curta e muito bem escrita sobre a emergência de organismos complexos a partir de precursores simples.

**Pace, N.R.** (2001) The universal nature of biochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 805–808.
Breve discussão da definição mais sucinta de vida, na Terra e em qualquer outro lugar.

## Fundamentos celulares

**Hardin, J., Beroni, G.P., & Kleinsmith, L.J.,** (2011) *Becker´s World of the Cell,* 8th edn, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Redwood City, CA.
Excelente texto introdutório de biologia celular.

**Hosking, C.R. & Schwartz, J.L.** (2009) The future's bright: imaging cell biology in the 21st century. *Trends Cell Biol*. **19**, 553–554.
Editorial introdutório curto deste fascículo completo de *Trends in Cell Biology* que versa sobre novos métodos de obter imagem de células.

**Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.R., Bretscher, A., Ploegh, H., & Amon, A.** (2012) *Molecular Cell Biology,* 7th edn, W. H. Freeman and Company, New York.
Texto excelente e útil para este e outros capítulos.

**Sadava, D., Hillis, D.M., Heller, H.C., Berenbaum, M.** (2010) *Life: The Science of Biology,* 9th edn, W. H. Freeman and Company, New York.

**Wilson, C., Venditti, R., Rega, L.R., Colanzi, A., D'Angelo, G., & DeMatteis, M.A.** (2011) The Golgi apparatus: an organelle with multiple complex functions. *Biochem. J*. **433**, 1-9.
Excelente revisão de nível intermediário sobre o papel do aparelho de Golgi.

## Fundamentos químicos

**Barta, N.S. & Stille, J.R.** (1994) Grasping the concepts of stereochemistry. *J. Chem. Educ.* **71**, 20–23.
Descrição clara do sistema RS para nomear estereoisômeros com sugestões práticas para determinar e recordar os tipos de isômeros.

**Thall, E.** (1996) When drug molecules look in the mirror. *J. Chem. Educ.* **73**, 481-484.
Diferenças biológicas entre isômeros (R) e (S) de fármacos.

**Vollhardt, K.P.C. & Shore, N.E.** (2011) *Organic Chemistry: Structure and Function,* 6th edn, W. H. Freeman and Company, New York.
Discussão atualizada sobre estereoquímica, grupos funcionais, reatividade e a química das principais classes de biomoléculas.

## Fundamentos físicos

**Atkins, P.W. & de Paula, J.** (2012) *Physical Chemistry for the Life Sciences,* 2nd edn, W. H. Freeman and Company, New York.

**Blum, H.F.** (1968) *Time's Arrow and Evolution,* 3rd edn, Princeton University Press, Princeton.
Excelente discussão de como a segunda lei da termodinâmica influenciou a evolução biológica.

## Fundamentos genéticos

**Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Lewinton, R.C. & Carroll, S.** (2008) *An Introduction to Genetic Analysis,* 9th edn, W. H. Freeman and Company, New York.

**Jacob, F.** (1973) *The Logic of Life: A History of Heredity,* Pantheon Books, Inc., New York. Originally published (1970) as *La logique du vivant: une histoire de l'hérédité,* Editions Gallimard, Paris.
Interessante relato histórico e filosófico dos eventos que levaram à atual compreensão molecular da vida.

**Pierce, B.** (2012) *Genetics: A Conceptual Approach*, 4th edn, W. H. Freeman and Company, New York.

## Fundamentos evolutivos

**Adams, J.C.** (2009) Molecular and cellular evolution: a celebration of the 200th anniversary of the birth of Charles Darwin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 249.
Introdução editorial a 14 ensaios sobre aspectos da evolução molecular e celular que compõem essa edição da revista.

**Brow, J.R. & Doolittle, W.F.** (1997) Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 456–502.
Discussão completa sobre os argumentos para colocar as archaeas no ramo filogenético que levou aos organismos multicelulares.

**Budin, I. & Szostak, J.W.** (2010) Expanding roles for diverse physical phenomena during the origin of life. *Annu. Rev. Biophysics.* **39**, 45-63.
Uma discussão cuidadosa dos fatores físicos que podem ter influenciado o curso da evolução prebiótica.

**Carroll, S.B.** (2006) *The Making of the Fittest: DNA and the Ultimate Forensic Record of Evolution,* W.W. Norton & Company, Inc., New York.

**Cavicchioli, R.** (2011) Archaea-timeline of the third domain. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 51-61.
Descrição de nível intermediário da descoberta e investigação das archaeas.

**de Duve, C.** (1995) The beginnings of life on earth. *Am. Sci.* **83**, 428–437.
Roteiro da sucessão dos passos químicos que levaram ao primeiro organismo vivo.

**de Duve, C.** (1996) The birth of complex cells. *Sci. Am.* **274** (April), 50–57.

**Evolution of Catalytic Function.** (1987) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52**.
Coleção de quase 100 artigos sobre todos os aspectos da evolução prebiótica e da evolução biológica inicial; excelente fonte sobre evolução molecular.

**Gesteland, R.F., Atkins, J.F., & Cech, T.R. (eds).** (2006) *The RNA World*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
Coleção de estimulantes revisões sobre uma ampla gama de tópicos relacionados ao roteiro do mundo do RNA.

**Knoll, A.H.** (2003) Life on a Young Planet: *The First Three Billion Years of Evolution on Earth*, Princeton University Press, Princeton.
Discussão dos estágios iniciais da evolução, com ênfase na geoquímica do meio ambiente no qual ela ocorreu.

**Lazcano, A. & Miller, S.L.** (1996) The origin and early evolution of life: prebiotic chemistry, the prerrNA world, and time. *Cell* **85**, 793–798.

Breve revisão do desenvolvimento dos estudos da origem da vida: atmosfera primitiva, fontes hidrotermais submarinas, origem autotrófica *versus* origem heterotrófica, os mundos do RNA e pré-RNA e o tempo requerido para a vida surgir.

**Martin, W., Baross, J., Kelley, D., & Russel, M.J.** (2008) Hydrothermal vents and the origin of life. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 805-814.

**Miller, S.L.** (1987) Which organic compounds could have occurred on the prebiotic earth? *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52**, 17–27.
Resumo de experimentos de laboratório sobre evolução química pela pessoa que realizou o experimento original de Miller-Urey.

**Noireaux, V., Maeda, Y.T., & Libchaber, A.** (2011) Development of an artificial cell, from self-organization to computation and self-reproduction. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* **108**, 3473-3480.
Discussão interessante dos passos que devem ser tomados, do início ao fim, para produzir uma célula viva.

**Parker, E.T., Cleaves, H.J., Dworkin, J.P., Glavin, D.P., Callahan, M., Aubrey, A., Lazcano, A., & Bada, J.L.** (2011) Primordial synthesis of amines and amino acids in a 1958 Miller $H_2S$-rich spark discharge experiment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 5526-5531.
Reexame moderno das amostras geradas em experimentos de 1958 por Miller, usando $H_2S$ como um dos gases atmosféricos.

**Stiller, J.W.** (2007) Plastid endosymbiosis, genome evolution and the origin of green plants. *Trends Plant Sci.* **12**, 391-396.

**Woese, C.R.** (2002) On the evolution of cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 8742–8747.
Revisão curta e clara.

**Woese, C.R.** (2004) A new biology for a new century. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 173–186.
Desenvolvimento do pensamento atual sobre a evolução celular por um dos mais destacados pensadores dessa área.

**Woese, C.R., Kandler, O., & Wheelis, M.L.** (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4576–4579.
Os argumentos para dividir todos os organismos vivos em três grupos.

## Problemas

Seguem alguns problemas relacionados ao conteúdo do capítulo. (Para solucionar os problemas de final de capítulo, o leitor pode consultar a contracapa da obra.) Cada problema tem um título para facilitar a referência e discussão. Para todos os problemas numéricos, mantenha em mente que as respostas devem ser expressas com número correto de algarismos significativos. Respostas resumidas estão no Apêndice B.

**1. O tamanho das células e seus componentes.**

(a) Se você for ampliar uma célula 10.000 vezes (ampliação típica conseguida no microscópio eletrônico), quão grande isso seria? Considere que você está vendo uma célula eucariótica "típica" com um diâmetro celular de 50 $\mu$m.

(b) Se essa célula for uma célula muscular (miócito), quantas moléculas de actina ela poderia conter? Assuma que a célula é esférica e que mais nenhum outro componente celular está presente; moléculas de actina são esféricas, com 3,6 nm de diâmetro. O volume da esfera é de 4/3 $\pi r^3$.

(c) Se essa fosse uma célula do fígado (hepatócito) com as mesmas dimensões, quantas mitocôndrias ela poderia conter? (Considere que a célula é esférica, nenhum outro componente celular está presente e a mitocôndria é esférica, com 1,5 $\mu$m de diâmetro.)

(d) A glicose é o principal nutriente produtor de energia para a maioria das células. Assumindo uma concentração celular de 1 mM (isto é, 1 milimol/L), calcule quantas moléculas de glicose podem estar presentes na nossa célula eucariótica hipotética (e esférica). (O número de Avogadro, o número de moléculas em 1 mol de substância não ionizada, é $6{,}02 \times 10^{23}$.)

(e) Hexocinase é uma enzima importante no metabolismo da glicose. Se a concentração de hexocinase nessa célula eucariótica for de 20 $\mu$M, quantas moléculas de glicose estão presentes para cada molécula de hexocinase?

**2. Componentes da *E. coli*.** Células de *E. coli* em forma de bastão têm cerca de 2 $\mu$m de comprimento e 0,8 $\mu$m de diâmetro. O volume de um cilindro é $\pi r^2 h$, onde $h$ é a altura do cilindro.

(a) Se a densidade média da *E. coli* (na maior parte água) é $1{,}1 \times 10^3$ g/L, qual é a massa de uma única célula?

(b) *E. coli* tem um envelope de proteção celular de 10 nm de espessura. Qual porcentagem do volume total da bactéria é ocupada pelo envelope?

(c) *E. coli* é capaz de crescer e se multiplicar rapidamente porque contém cerca de 15.000 ribossomos esféricos (diâmetros de 18 nm), que realizam a síntese de proteínas. Qual porcentagem do volume celular é ocupada pelos ribossomos?

**3. Informação genética no DNA da *E. coli*.** A informação genética contida no DNA consiste em uma sequência linear de unidades codificantes, conhecida como códon. Cada códon é uma sequência específica de três desoxirribonucleotídeos (três pares de desoxirribonucleotídeos no DNA fita dupla), e cada códon codifica uma unidade de aminoácido na proteína. O peso molecular de uma molécula de DNA de *E. coli* é de cerca de $3{,}1 \times 10^9$ g/mol. O peso molecular médio do par de nucleotídeo é 660 g/mol, e cada par de nucleotídeo contribui com 0,34 nm de comprimento do DNA.

(a) Calcule o comprimento de uma molécula de DNA da *E. coli*. Compare o comprimento da molécula de DNA com as dimensões da célula (ver Problema 2). Como a molécula de DNA cabe dentro da célula?

(b) Assumindo que uma proteína média na *E. coli* consiste em uma cadeia de 400 aminoácidos, qual é o número máximo de proteínas que podem ser codificadas por uma molécula de DNA de *E. coli*?

**4. A alta taxa do metabolismo bacteriano.** As células bacterianas têm taxa de metabolismo muito mais alta que as células animais. Sob condições ideais, algumas bactérias dobram de tamanho e se dividem a cada 20 minutos, enquanto muitas células animais sob condições de crescimento rápido requerem 24 horas. A alta taxa do metabolismo bacteriano requer uma elevada relação área de superfície-volume celular.

(a) Por que a relação superfície-volume afeta a taxa máxima do metabolismo?

(b) Calcule a relação superfície-volume para a bactéria *Neisseria gonorrhoeae* esférica (0,5 $\mu$m de diâmetro), responsável pela doença gonorreia. Compare-a com a relação superfície-volume da ameba globular, uma grande célula eucariótica (150 $\mu$m de diâmetro). A área da superfície de uma esfera é dada por 4 $\pi r^2$.

**5. O transporte rápido dos axônios.** Os neurônios têm uma fina e longa extensão chamada de axônio, estrutura especializada em conduzir sinais através do sistema nervoso do organismo. Alguns axônios podem ter 2 m de comprimento – p. ex., os axônios que se originam na medula espinal e ter-

minam nos músculos dos dedos dos pés. Pequenas vesículas envoltas por membrana e que carregam materiais essenciais para o funcionamento do axônio se movem ao longo de microtúbulos do citoesqueleto desde o corpo celular até a extremidade dos axônios. Se a velocidade média de uma vesícula é de 1 m/s, quanto tempo levará para a vesícula se mover do corpo celular que está localizado na medula espinal até a ponta axonal nos dedos?

**6. A vitamina C sintética é tão boa quanto a vitamina natural?** Uma alegação manifestada por alguns fornecedores de alimentos naturais é a de que as vitaminas obtidas de fontes naturais são mais saudáveis do que as obtidas por síntese química. Por exemplo, o ácido L-ascórbico (vitamina C) puro extraído dos frutos da roseira silvestre seria melhor do que o ácido L-ascórbico puro produzido pela indústria química. Existe alguma diferença entre as vitaminas das duas fontes? Pode o corpo distinguir a fonte de origem das vitaminas?

**7. Identificação de grupos funcionais.** As Figuras 1-16 e 1-17 mostram alguns grupos funcionais comuns de biomoléculas. Devido ao fato de as propriedades e atividades biológicas das biomoléculas serem basicamente determinadas pelos seus grupos funcionais, é importante poder identificá-las. Em cada um dos compostos abaixo, circule e identifique o nome de cada grupo funcional.

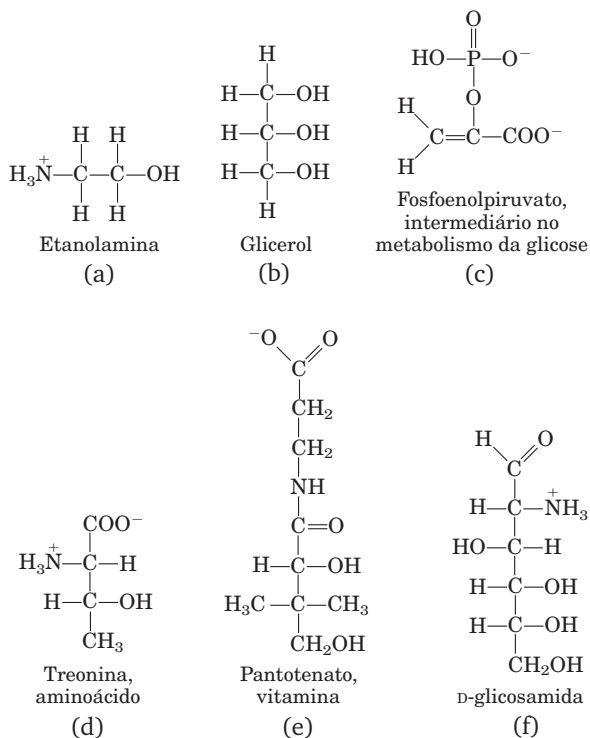
Etanolamina (a)

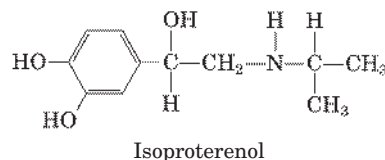
Glicerol (b)

Fosfoenolpiruvato, intermediário no metabolismo da glicose (c)

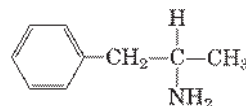
Treonina, aminoácido (d)

Pantotenato, vitamina (e)

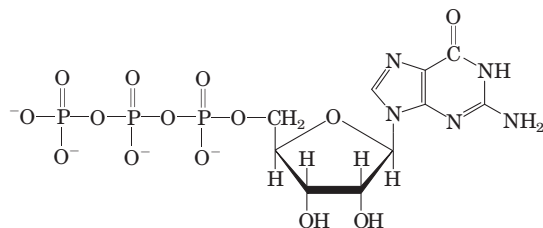
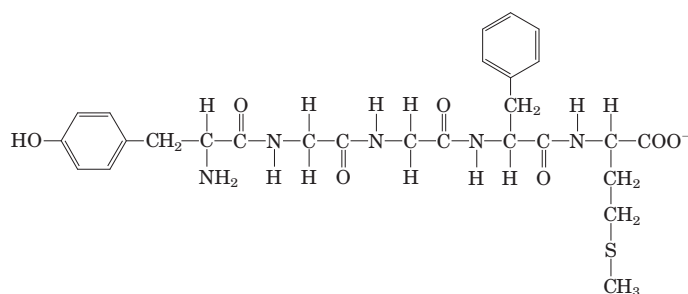
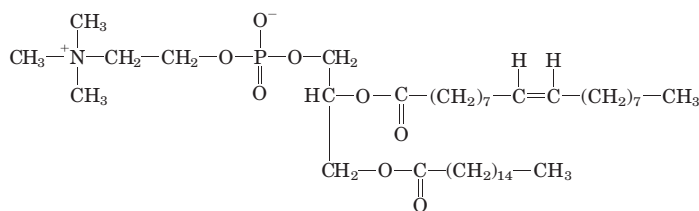
D-glicosamida (f)

**8. Atividade de fármacos e estereoquímica.** As diferenças quantitativas na atividade biológica entre dois enantiômeros de um composto algumas vezes são enormes. Por exemplo, o isômero D do fármaco isoproterenol, usado no tratamento de asma leve, é de 50 a 80 vezes mais efetivo como broncodilatador do que o L isômero. Identifique o centro quiral no isoproterenol. Por que os dois enantiômeros têm bioatividades tão radicalmente diferentes?

Isoproterenol

**9. Separação de biomoléculas.** No estudo de uma biomolécula particular (proteína, ácido nucleico, carboidrato ou lipídeo) no laboratório, o bioquímico primeiro precisa separá-la das outras moléculas da amostra – isto é, precisa *purificá-la*. Técnicas de purificação específicas são descritas mais adiante no texto. Entretanto, olhando-se as subunidades monoméricas de uma biomolécula, tem-se alguma ideia sobre as características da molécula que vão permitir separá-la das outras moléculas. Por exemplo, como você separaria (a) aminoácidos de ácidos graxos e (b) nucleotídeos de glicose?

**10. Vida baseada em silício?** O silício está no mesmo grupo do carbono na tabela periódica e, tal como o carbono, pode formar até quatro ligações simples. Muitas histórias de ficção científica tem se baseado na premissa da vida baseada em silício. Será que isso é possível? Quais características do silício o tornam menos adaptado que o carbono como elemento central de organização da vida? Para responder, considere o que você aprendeu sobre a versatilidade de ligação do carbono, e consulte um livro-texto introdutório de química inorgânica sobre propriedades de ligação do silício.

**11. A ação dos fármacos e a forma das moléculas.** Há alguns anos, duas companhias farmacêuticas introduziram no mercado um fármaco sob os nomes comerciais Dexedrina e Benzedrina. A estrutura do fármaco é mostrada abaixo.

As propriedades físicas (análise de C, H e N, ponto de fusão, solubilidade, etc.) da Dexedrine e de Benzedrine eram idênticas. A dose oral recomendada de Dexedrine (que ainda está disponível) era de 5 mg/dia, mas a dose recomendada de Benzedrine (não mais disponível) era duas vezes esse valor. Aparentemente, havia uma necessidade bem maior de Benzedrina do que de Dexedrina para produzir a mesma resposta fisiológica. Explique essa aparente contradição.

**12. Componentes de biomoléculas complexas.** A Figura 1-10 mostra os principais componentes de biomoléculas complexas. Para cada uma das três importantes biomoléculas a seguir (mostradas na sua forma ionizada em pH fisiológico), identifique os constituintes.

(a) Trifosfato de guanosina (GTP), nucleotídeo rico em energia que serve como precursor do RNA:

(b) Encefalina-metionina, o ópio do cérebro:

(c) Fosfatidilcolina, componente de muitas membranas:

**13. Determinação da estrutura de uma biomolécula.** Uma substância desconhecida, X, foi isolada de músculo de coelho. Sua estrutura foi determinada a partir das seguintes observações e experimentos. A análise qualitativa mostrou que X era inteiramente composta por C, H e O. Uma amostra de X foi pesada e oxidada completamente, e $H_2O$ e $CO_2$ produzidos foram medidos; esta análise quantitativa revelou que X continha 40,00% de C, 6,71% de H e 53,29% de O em peso. A massa molecular de X, determinada por espectrometria de massa, foi 90,00 u (unidades de massa atômica; ver Quadro 1-1). Espectroscopia infravermelha mostrou que X continha uma dupla ligação. X dissolveu prontamente em água produzindo uma solução ácida, que demonstrou atividade óptica quando testada no polarímetro.

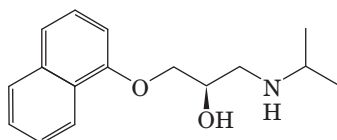
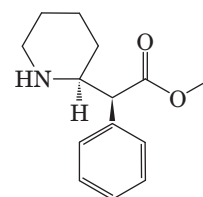
(a) Determine a fórmula empírica e molecular de X.

(b) Desenhe as possíveis estruturas de X que se ajustam à fórmula molecular e contêm uma ligação dupla. Considere *somente* estruturas lineares e ramificadas e despreze estruturas cíclicas. Observe que o oxigênio faz ligações muito pobres consigo mesmo.

(c) Qual é o significado estrutural da atividade óptica observada? Quais estruturas em (b) são consistentes com a observação?

(d) Qual é o significado estrutural da observação de que a solução de X era ácida? Quais estruturas em (b) são consistentes com a observação?

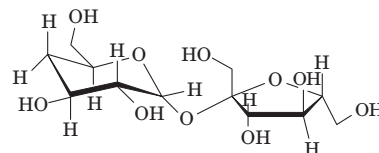
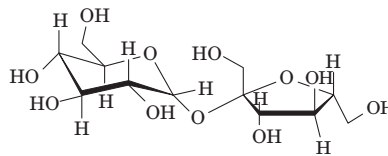
(e) Qual é a estrutura de X? Mais de uma estrutura é consistente com todos os dados?

**14. Nomenclatura de estereoisômeros com um carbono quiral usando o sistema RS.** Propranolol é um composto quiral. ($R$)-Propranolol é usado como contraceptivo; ($S$)-propranolol é usado no tratamento da hipertensão. Identifique o carbono quiral na estrutura abaixo. Esse é o isômero ($R$) ou ($S$)? Desenhe o outro isômero.

**15. Nomenclatura de estereoisômeros com dois carbonos quirais usando o sistema RS.** O isômero ($R,R$) do metilfenidato (Ritalina) é usado para tratar o transtorno de déficit de atenção/hiperatividade (TDAH). O isômero ($S,S$) é um antidepressivo. Identifique os dois carbonos quirais na estrutura abaixo. Este é o isômero ($R,R$) ou ($S,S$)? Desenhe o outro isômero.

## Problemas de análise de dados

**16. Interação de moléculas de sabor doce com receptores para sabor.** Muitos compostos têm gosto doce para humanos. O gosto doce resulta quando uma molécula se liga ao receptor doce, um tipo de receptor de sabor, na superfície de certas células da língua. Quanto mais forte a ligação, menor a concentração requerida para saturar o receptor e mais doce será o gosto da uma substância em uma dada concentração. A energia livre padrão, $\Delta G°$, da reação de ligação entre uma molécula doce e um receptor para sabor doce pode ser medida em quilojoules ou quilocalorias por mol.

O gosto doce pode ser quantificado em unidades de "doçura molar relativa" (DMR), uma medida que compara a doçura de uma substância com a doçura da sacarose. Por exemplo, a sacarina tem uma DMR de 161; isso significa que a sacarina é 161 vezes mais doce que a sacarose. Em termos práticos, isso é medido pedindo-se a voluntários humanos para comparar a doçura de soluções contendo diferentes concentrações de cada composto. Os gostos da sacarose e da sacarina são igualmente doces quando a sacarose está na concentração 161 vezes maior do que a da sacarina.

(a) Qual é a relação entre DMR e $\Delta G°$ da reação de ligação? Especificamente, um $\Delta G°$ mais negativo corresponde a uma DMR maior ou menor? Explique seu raciocínio.

A seguir é mostrada a estrutura de 10 compostos, todos de sabor doce para humanos. A DMR e o $\Delta G°$ de ligação ao receptor para doce são dados para cada substância.

Desoxissacarose
DMR = 0,95
$\Delta G° = -6{,}67$ kcal/mol

Sacarose
DMR = 1
$\Delta G° = -6{,}71$ kcal/mol

D-Triptofano
DMR = 21
$\Delta G^\circ = -8{,}5$ kcal/mol

Sacarina
DMR = 161
$\Delta G^\circ = -9{,}7$ kcal/mol

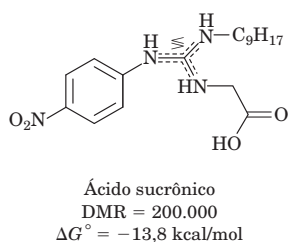
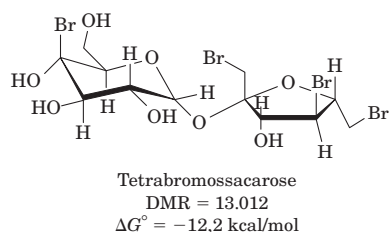
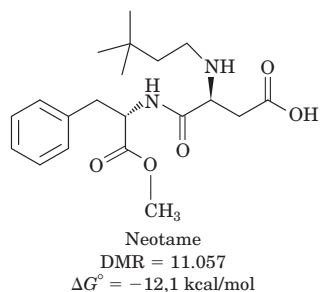
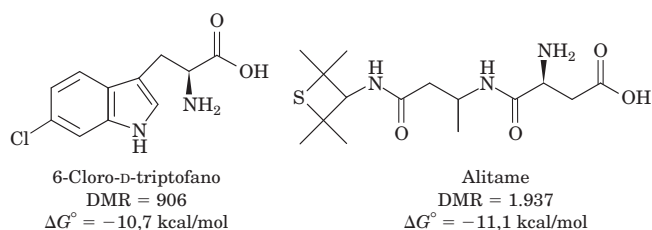
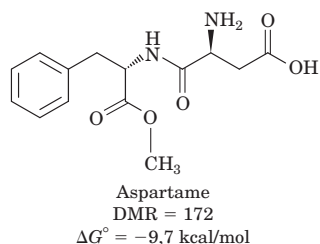
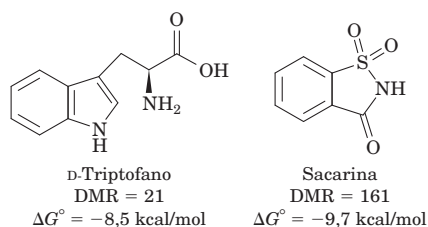
Aspartame
DMR = 172
$\Delta G^\circ = -9{,}7$ kcal/mol

6-Cloro-D-triptofano
DMR = 906
$\Delta G^\circ = -10{,}7$ kcal/mol

Alitame
DMR = 1.937
$\Delta G^\circ = -11{,}1$ kcal/mol

Neotame
DMR = 11.057
$\Delta G^\circ = -12{,}1$ kcal/mol

Tetrabromossacarose
DMR = 13.012
$\Delta G^\circ = -12{,}2$ kcal/mol

Ácido sucrônico
DMR = 200.000
$\Delta G^\circ = -13{,}8$ kcal/mol

Morini, Bassoli e Temussi (2005) utilizaram métodos computacionais (frequentemente referidos como métodos "*in silico*") para modelar a ligação de moléculas doces a receptores para doce.

(b) Por que é útil ter um modelo de computador para predizer a doçura de moléculas, em vez de ensaios de sabor usando-se humanos e animais?

Em um trabalho anterior, Schallenberger e Acree (1967) sugeriram que todas as moléculas doces incluem o grupo estrutural "AH-B", no qual "A e B são átomos eletronegativos separados por uma distância maior que 2,5 Å [0,25 nm], mas menor que 4 Å [0,4 nm]. H é um átomo de hidrogênio ligado a um dos átomos eletronegativos por uma ligação covalente."

(c) Dado que o comprimento de uma ligação simples "típica" é de cerca de 0,15 nm, identifique o(s) grupo(s) AH-B em cada molécula mostrada à esquerda.

(d) Com base em seus resultados de (c), dê duas objeções à afirmação de que "moléculas contendo uma estrutura AH-B terão gosto doce".

(e) Para duas das moléculas mostradas aqui, o modelo AH-B *pode* ser usado para explicar a diferença de valores de DMR e $\Delta G^\circ$. Quais são essas duas moléculas e como você as usaria para defender o modelo AH-B?

(f) Muitas das moléculas têm estruturas parecidas, mas valores de DMR e $\Delta G^\circ$ muito diferentes. Dê dois exemplos, e use-os para argumentar que o modelo AH-B é incapaz de explicar as diferenças observadas na doçura.

Em seus estudos de modelos computacionais, Morini e colaboradores usaram a estrutura tridimensional do receptor doce e um programa de modelagem de dinâmica molecular chamado de GRAMM para predizer o $\Delta G^\circ$ da ligação de moléculas doces ao receptor de doce. Primeiro, eles "treinaram" seu modelo – isto é, aprimoraram os parâmetros de modo que os valores de $\Delta G^\circ$ preditos pelo modelo se ajustavam ao valor conhecido de $\Delta G^\circ$ para um conjunto de moléculas doces ("conjunto de treino"). Em seguida, "testaram" o modelo indagando a predição dos valores de $\Delta G^\circ$ para um novo conjunto de moléculas ("conjunto de teste").

(g) Por que Morini e colaboradores tiveram que testar seu modelo com um conjunto de moléculas diferentes do conjunto de moléculas usadas para treinar o modelo?

(h) Os pesquisadores constataram que os valores de $\Delta G^\circ$ previstos para o conjunto de teste diferiram dos valores corretos, na média, em 1,3 kcal/mol. Usando os valores dados para as estruturas moleculares apresentadas, estime o erro resultante nos valores de DMR.

## Referências

**Morini, G., Bassoli, A., & Temussi, P.A.** (2005) From small sweeteners to sweet proteins: anatomy of the binding sites of the human T1R2_T1R3 receptor. *J. Med. Chem.* **48**, 5520–5529.

**Schallenberger, R.S. & Acree, T.E.** (1967) Molecular theory of sweet taste. *Nature* **216**, 480–482.

# PARTE I

# Estrutura e Catálise



A bioquímica não é nada menos que a "química da vida" e, sim, a vida pode ser investigada, analisada e compreendida. Para iniciar, todo estudante de bioquímica precisa tanto de uma linguagem quanto de alguns fundamentos; isso é fornecido na Parte I.

Os capítulos da Parte I são dedicados à estrutura e à função das principais classes de constituintes celulares: água (Capítulo 2), aminoácidos e proteínas (Capítulos 3 a 6), açúcares e polissacarídeos (Capítulo 7), nucleotídeos e ácidos nucleicos (Capítulo 8), ácidos graxos e lipídeos (Capítulo 10) e, finalmente, membranas e proteínas sinalizadoras de membrana (Capítulos 11 e 12). Também é discutida, no contexto de estrutura e função, a tecnologia utilizada para estudar cada tipo de biomolécula. Um capítulo inteiro (Capítulo 9) é dedicado às biotecnologias associadas com a clonagem e a genômica.

O Capítulo 2 aborda a água porque suas propriedades afetam a estrutura e a função de todos os outros constituintes celulares. Para cada classe de moléculas orgânicas, primeiro será considerada a química covalente das unidades monoméricas (aminoácidos, monossacarídeos, nucleotídeos e ácidos graxos) e então, descrita a estrutura das macromoléculas e dos complexos supramoleculares derivados dessas. Um tema relevante é que as macromoléculas poliméricas em sistemas vivos, embora grandes, são entidades químicas altamente ordenadas com sequências específicas de subunidades monoméricas que lhes conferem estruturas distintas e funcionais. Esse tema fundamental pode ser subdividido em três princípios inter-relacionados: 1) a estrutura única de cada macromolécula determina sua função; 2) as interações não covalentes exercem o papel essencial na estrutura e, por isso, na função das macromoléculas; e 3) as subunidades monoméricas em macromoléculas poliméricas ocorrem em sequências específicas, representando uma forma de informação da qual o estado ordenado vivo depende.

A relação entre a estrutura e a função é especialmente evidente em proteínas que exibem uma extraordinária diversidade de funções. Uma determinada sequência polimérica de aminoácidos produz uma estrutura fibrosa forte, encontrada no cabelo e na lã; outra produz uma proteína que transporta oxigênio no sangue; uma terceira liga outras proteínas e catalisa a clivagem das ligações entre seus aminoácidos. Similarmente, as funções especiais de polissacarídeos, de ácidos nucleicos e de lipídeos podem ser compreendidas como o resultado direto da sua estrutura química, com suas subunidades monoméricas características ligadas precisamente para formar polímeros funcionais. Açúcares ligados entre si se tornam depósitos de energia, de fibras estruturais e de pontos para reconhecimentos moleculares específicos; nucleotídeos enfileirados ao longo do DNA ou do RNA fornecem as informações para um organismo inteiro; e lipídeos agregados formam membranas. O Capítulo 12 unifica a discussão da função das biomoléculas, descrevendo como os sistemas sinalizadores específicos regulam as atividades das biomoléculas – dentro de uma célula, dentro de um órgão e entre órgãos – para manter um organismo em homeostasia.

À medida que se passa das unidades monoméricas para os polímeros sempre maiores, o foco químico muda de ligações covalentes para interações não covalentes. As ligações covalentes em nível monomérico e macromolecular impõem restrições ao formato assumido pelas biomoléculas grandes. São as numerosas interações não covalentes, contudo, que ditam a conformação nativa estável das moléculas grandes, ao mesmo tempo em que permitem a flexibilidade necessária para a sua função biológica. Como será visto, interações não covalentes são essenciais ao poder catalítico das enzimas, à crítica interação entre bases complementares nos ácidos nucleicos e ao arranjo e propriedades de lipídeos e membranas. O princípio de que sequências de subunidades monoméricas são ricas em informação fica mais evidente na discussão dos ácidos nucleicos (Capítulo 8). No entanto, as proteínas e alguns polímeros curtos de açúcares (oligossacarídeos) são também moléculas ricas em informação. A sequência de aminoácidos é uma forma de informação que determina o enovelamento da proteína na sua estrutura tridimensional única, que determina a sua função. Alguns oligossacarídeos também têm sequências únicas e estruturas tridimensionais, que são reconhecidas por outras macromoléculas.

Cada classe de moléculas tem uma hierarquia estrutural similar: subunidades de estrutura fixa são conectadas por ligações de flexibilidade limitada, para formar macromoléculas com estrutura tridimensional determinada por interações não covalentes. Essas macromoléculas interagem para formar as estruturas supramoleculares e as organelas, que permitem à célula desempenhar suas várias funções metabólicas. Juntas, as moléculas descritas na Parte I são o material da vida.

# 2

# Água



A água é a substância mais abundante nos sistemas vivos, constituindo mais de 70% do peso da maioria dos organismos. O primeiro organismo vivo na Terra sem dúvida nasceu em ambiente aquoso, e o curso da evolução tem sido moldado pelas propriedades do meio aquoso no qual a vida começou.

Este capítulo inicia com descrições das propriedades físicas e químicas da água, às quais são adaptados todos os aspectos da estrutura e da função da célula. As forças de atração entre as moléculas da água e a menor tendência da água em ionizar são de crucial importância para a estrutura e a função das biomoléculas. Será revisado o tópico da ionização em termos das constantes de equilíbrio, pH e curvas de titulação, sendo considerado como as soluções aquosas de ácidos fracos ou bases fracas e seus sais agem contra as mudanças de pH em sistemas biológicos. A molécula de água e seus produtos de ionização, $H^+$ e $OH^-$, influenciam profundamente a estrutura, a organização e as propriedades de todos os componentes celulares, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. As interações não covalentes responsáveis pela resistência e especificidade do reconhecimento entre as biomoléculas são decisivamente influenciadas pelas propriedades da água como solvente, incluindo sua capacidade de formar ligações de hidrogênio com ela mesma e com solutos.

## 2.1 Interações fracas em sistemas aquosos

As ligações de hidrogênio entre moléculas de água fornecem as forças coesivas que fazem da água um líquido a temperatura ambiente e um sólido cristalino (gelo) com arranjo altamente ordenado de moléculas em temperaturas frias. As biomoléculas polares se dissolvem facilmente em água porque elas podem substituir interações entre as moléculas de água (água-água) por interações energeticamente mais favoráveis entre a água e o soluto (água-soluto). Em contrapartida, as biomoléculas apolares são muito pouco solúveis em água porque elas interferem nas interações do tipo água-água, mas são incapazes de formar interações do tipo água-soluto. Em soluções aquosas, moléculas apolares tendem a formar agregados. Ligações de hidrogênio e interações iônicas, hidrofóbicas (do grego, "medo de água") e de van der Waals são individualmente fracas, mas coletivamente têm influência significativa nas estruturas tridimensionais de proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídeos de membranas.

### As ligações de hidrogênio são responsáveis pelas propriedades incomuns da água

A água tem ponto de fusão, ebulição e calor de vaporização mais alto que os outros solventes comuns (Tabela 2-1). Essas propriedades incomuns são uma consequência da atração entre as moléculas de água adjacentes que oferecem à água líquida grande coesão interna. A visualização da estrutura eletrônica da molécula de $H_2O$ revela a origem dessas atrações intermoleculares.

Cada átomo de hidrogênio de uma molécula de água compartilha um par de elétrons com o átomo central do oxigênio. A geometria da molécula é ditada pela forma dos orbitais eletrônicos mais externos do átomo de oxigênio, que são similares aos orbitais ligantes $sp^3$ do carbono (ver Figura 1-15). Esses orbitais descrevem um formato aproximado de tetraedro, com um átomo de hidrogênio em cada um de dois vértices e pares de elétrons não compartilhados nos outros dois (**Figura 2-1a**). O ângulo de ligação H—O—H é de 104,5°, levemente menor que o ângulo 109,5° de um tetraedro perfeito, devido ao agrupamento dos orbitais não ligantes do átomo de oxigênio.

O núcleo do átomo de oxigênio atrai elétrons mais fortemente que o núcleo de hidrogênio (um próton); ou seja, o oxigênio é mais eletronegativo. Isso significa que os elétrons compartilhados estão mais frequentemente nas vizinhanças do átomo de oxigênio que os de hidrogênio. O resultado desse compartilhamento desigual de elétrons é a formação de dois dipolos elétricos na molécula de água, um ao longo de cada ligação O—H; cada hidrogênio carrega carga parcial positiva ($\delta+$) e o oxigênio carrega carga parcial negativa igual em magnitude à soma das duas cargas parciais positivas ($2\delta-$). Como resultado, existe uma atração

**TABELA 2-1** Ponto de fusão, ponto de ebulição e calor de vaporização de alguns solventes comuns

| | Ponto de fusão (ºC) | Ponto de ebulição (ºC) | Calor de vaporização (J/g)* |
|---|---|---|---|
| Água | 0 | 100 | 2.260 |
| Metanol ($CH_3OH$) | –98 | 65 | 1.100 |
| Etanol ($CH_3CH_2OH$) | –117 | 78 | 854 |
| Propanol ($CH_3CH_2CH_2OC$) | –127 | 97 | 687 |
| Butanol ($CH_3(CH_2)_2CH_2OC$) | –90 | 117 | 590 |
| Acetona ($CH_3COCH_3$) | –95 | 56 | 523 |
| Hexano ($CH_3(CH_2)_4CH_3$) | –98 | 69 | 423 |
| Benzeno ($C_6H_6$) | 6 | 80 | 394 |
| Butano ($CH_3(CH_2)_2CH_3$) | –135 | –0,5 | 381 |
| Clorofórmio ($CHCL_3$) | –63 | 61 | 247 |

*A energia na forma de calor necessária para levar 1,0 g de um líquido no seu ponto de ebulição e na pressão atmosférica até seu estado gasoso na mesma temperatura. Essa é uma medida direta da energia necessária para superar as forças de atração entre as moléculas na fase líquida.

eletrostática entre o átomo de oxigênio de uma molécula de água e o hidrogênio de outra (Figura 2-1b), chamada de **ligação de hidrogênio**. Ao longo deste livro, as ligações de hidrogênio serão representadas com três linhas paralelas azuis, como na Figura 2-1b.

Ligações de hidrogênio são relativamente fracas. Aquelas em água líquida têm **energia de dissociação de ligação** (a energia requerida para quebrar uma ligação) de cerca de 23 kJ/mol, comparada com 470 kJ/mol para uma ligação covalente O—H em água ou 348 kJ/mol para uma ligação covalente C—C. A ligação de hidrogênio é cerca de 10% covalente, devido às sobreposições nos orbitais de ligação, e cerca de 90% eletrostática. Em temperatura ambiente, a energia térmica de uma solução aquosa (a energia cinética do movimento de átomos individuais e moléculas) é da mesma ordem de magnitude que a requerida para quebrar ligações de hidrogênio. Quando a água é aquecida, o aumento da temperatura se reflete no aumento da velocidade individual das moléculas de água. Em qualquer dado momento, a maioria das moléculas na água líquida é ligada por hidrogênios, mas o tempo de vida de cada ligação de hidrogênio é somente de 1 a 20 picossegundos (1 ps = $10^{-12}$ s); quando uma ligação de hidrogênio quebra, outra ligação de hidrogênio se forma, em 0,1 ps, com a mesma molécula ou com outra. A expressão *flickering clusters*, agrupamentos oscilantes, tem sido aplicada aos grupos de moléculas de água de vida curta interligadas por ligações de hidrogênio na água líquida. A soma de todas as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água confere à água líquida uma grande coesão interna. Redes estendidas de moléculas de água unidas por ligações de hidrogênio também formam pontes entre solutos (proteínas e ácidos nucleicos) que permitem que as moléculas maiores interajam umas com as outras por distâncias de vários nanômetros sem se tocarem fisicamente.

**FIGURA 2-1 Estrutura da molécula de água. (a)** A natureza dipolar da molécula de água é mostrada em modelo de esfera e bastão; as linhas tracejadas representam os orbitais não ligantes. Existe um arranjo aproximadamente tetraédrico dos pares de elétrons mais externos da camada ao redor do átomo de oxigênio; os dois átomos de hidrogênio têm cargas parciais positivas localizadas ($\delta+$) e o átomo de oxigênio tem carga parcial negativa ($\delta-$). **(b)** Duas moléculas de $H_2O$ unidas por ligação de hidrogênio (representada aqui e ao longo deste livro por três linhas azuis) entre o átomo de oxigênio da molécula mais acima e um átomo de hidrogênio da molécula mais abaixo. As ligações de hidrogênio são mais longas e mais fracas que as ligações covalentes O—H.

O arranjo aproximadamente tetraédrico dos orbitais ao redor do átomo de oxigênio (Figura 2-1a) permite que cada molécula de água forme ligações de hidrogênio com até quatro moléculas de água vizinhas. Na água líquida, em temperatura ambiente e pressão atmosférica, entretanto, as moléculas de água estão desorganizadas e em movimento contínuo, assim cada molécula forma ligação de hidrogênio com somente 3,4 outras moléculas, em média. No gelo, por outro lado, cada molécula de água está fixa no espaço e forma ligações de hidrogênio com quatro outras moléculas, formando uma estrutura de rede regular (**Figura 2-2**). As ligações de hidrogênio são responsáveis pelo ponto de fusão relativamente alto da água, pois muita energia térmica é necessária para quebrar uma proporção suficiente de ligações de hidrogênio de forma a desestabilizar a rede cristalina do gelo (Tabela 2-1). Quando o gelo funde ou a água evapora, o calor é retirado do sistema:

$$H_2O\ (\text{sólido}) \rightarrow H_2O\ (\text{líquido}) \qquad \Delta H = +5{,}9\ \text{kJ/mol}$$
$$H_2O\ (\text{líquido}) \rightarrow H_2O\ (\text{gasoso}) \qquad \Delta H = +44{,}0\ \text{kJ/mol}$$

**FIGURA 2-2** **Ligações de hidrogênio no gelo.** No gelo, cada molécula de água forma quatro ligações de hidrogênio, o máximo possível para uma molécula de água, criando uma estrutura de rede regular. Por outro lado, na água líquida em temperatura ambiente e pressão atmosférica, cada molécula de água faz uma média de 3,4 ligações de hidrogênio com outras moléculas. Essa rede cristalina regular faz o gelo ser menos denso que a água líquida; portanto, o gelo flutua na água líquida.

Durante a fusão ou a evaporação, a entropia do sistema aquoso aumenta, à medida que as disposições mais ordenadas das moléculas de água em forma de gelo passam a assumir disposições menos ordenadas no estado líquido ou completamente desordenadas no estado gasoso. Em temperatura ambiente, tanto a fusão do gelo quanto a evaporação da água ocorre espontaneamente; a tendência das moléculas de água a associarem-se por meio das ligações de hidrogênio é compensada pela tendência energética para a desordem. Lembre-se de que a energia livre ($\Delta G$) deve ter um valor negativo para que um processo ocorra espontaneamente: $\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S$, onde $\Delta G$ representa a força motriz, $\Delta H$ a variação de entalpia de formação e quebra de ligações, e $\Delta S$ a variação no nível de desordem. Como o $\Delta H$ é positivo para a fusão e a evaporação, fica evidente que é o aumento na entropia ($\Delta S$) que torna o $\Delta G$ negativo, sendo responsável pela mudança de estado.

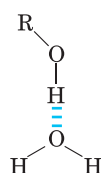
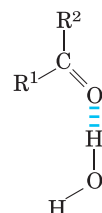
## A água forma ligações de hidrogênio com solutos polares

As ligações de hidrogênio não são exclusivas para a molécula de água. Elas se formam prontamente entre um átomo eletronegativo (aceptor de hidrogênio, geralmente oxigênio ou nitrogênio) e um átomo de hidrogênio ligado covalentemente a outro átomo eletronegativo (doador de hidrogênio) na mesma molécula ou em outra (**Figura 2-3**). Átomos de hidrogênio covalentemente ligados a átomos de carbono não participam de ligações de hidrogênio, porque o átomo de carbono é somente um pouco mais eletronegativo que o hidrogênio e, portanto, a ligação C—H é apenas levemente polar. A distinção explica por que o butanol ($CH_3(CH_2)_2CH_2OH$) tem ponto de ebulição relativamente alto (117°C), enquanto o butano ($CH_3(CH_2)_2CH_3$) tem ponto de ebulição de apenas –0,5°C. O butanol tem um grupo polar hidroxila e, portanto, pode formar ligações de hidrogênio intermoleculares. Biomoléculas polares não carregadas como os açúcares dissolvem rapidamente em água devido ao efeito estabilizador das ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila ou o oxigênio da carbonila do açúcar com as moléculas polares da água. Alcoóis, aldeídos, cetonas e compostos contendo ligações N—H formam ligações de hidrogênio com moléculas de água (**Figura 2-4**) e tendem a ser solúveis em água.

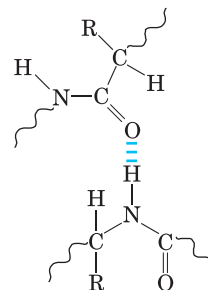
Aceptor de hidrogênio

Doador de hidrogênio

**FIGURA 2-3** **Ligações de hidrogênio comuns em sistemas biológicos.** O aceptor de hidrogênio geralmente é o oxigênio ou o nitrogênio; o doador de hidrogênio é outro átomo eletronegativo.

Entre o grupo hidroxila de um álcool e água

Entre o grupo carbonila de uma cetona e água

Entre grupos peptídicos em polipeptídeos

Entre bases complementares de DNA

Timina

Adenina

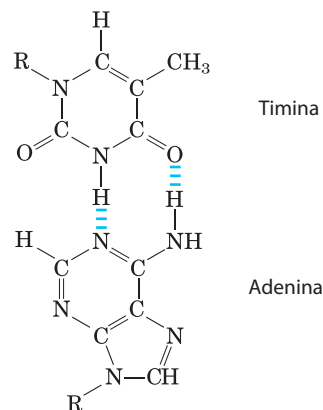



**FIGURA 2-4** **Algumas ligações de hidrogênio de importância biológica.**

Ligação de hidrogênio forte

Ligação de hidrogênio mais fraca

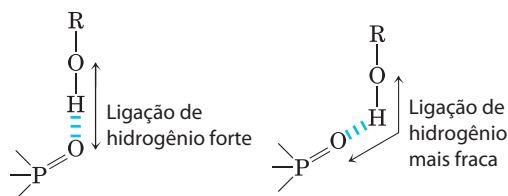



**FIGURA 2-5 Orientação das ligações de hidrogênio.** A atração entre as cargas elétricas parciais (ver Figura 2-1) é máxima quando os três átomos envolvidos na ligação (nesse caso, O, H e O) estão dispostos em linha reta. Quando as partes ligadas por hidrogênio estão estruturalmente restritas (p. ex., quando constituem parte de uma molécula de proteína isolada), a geometria ideal talvez não seja possível e a ligação de hidrogênio resultante é mais fraca.

As ligações de hidrogênio são mais fortes quando as moléculas ligadas estão orientadas de forma a maximizar as interações eletrostáticas, o que ocorre quando o átomo de hidrogênio e os dois átomos que o compartilham estão em linha reta – isto é, quando o átomo aceptor está alinhado com a ligação covalente entre o átomo doador e o hidrogênio (**Figura 2-5**). Esse arranjo dispõe as cargas positivas do íon hidrogênio diretamente entre as duas cargas parciais negativas. As ligações de hidrogênio são, portanto, altamente direcionais e capazes de manter duas moléculas ou grupos unidos por ligações de hidrogênio em um arranjo de geometria específica. Como será visto posteriormente, essa propriedade das ligações de hidrogênio confere estruturas tridimensionais muito precisas a moléculas proteicas e ácidos nucleicos, que têm muitas ligações de hidrogênio intramoleculares.

## A água interage eletrostaticamente com solutos carregados

A água é um solvente polar. Ela dissolve prontamente a maioria das biomoléculas, que em geral são compostos carregados ou polares (Tabela 2-2); compostos que se dissolvem facilmente em água são **hidrofílicos** (do grego "que ama a água"). Em contrapartida, solventes apolares, como clorofórmio e benzeno, são solventes ruins para biomoléculas polares, mas dissolvem prontamente moléculas **hidrofóbicas** – moléculas apolares como lipídeos e ceras.

A água dissolve sais como o NaCl pela hidratação e estabilização dos íons $Na^+$ e $Cl^-$, enfraquecendo as interações eletrostáticas entre eles e, portanto, neutralizando a sua tendência de se associar em uma rede cristalina (**Figura 2-6**). A água também dissolve prontamente biomoléculas carregadas, incluindo compostos com grupos funcionais como grupos carboxílicos ionizados ($—COO^-$), aminas protonadas ($—NH_3^+$) e ésteres de fosfato ou anidridos. A água substitui as ligações de hidrogênio soluto-soluto conectando essas biomoléculas umas com as outras por ligações de hidrogênio soluto-água, blindando as interações eletrostáticas entre as moléculas de soluto.

A água é efetiva na blindagem de interações eletrostáticas entre íons dissolvidos devido à sua alta constante dielétrica, uma propriedade física que reflete o número de dipolos em um solvente. A resistência, ou força ($F$), das interações iônicas depende da magnitude das cargas ($Q$), da distância entre os grupos carregados ($r$) e da constante dielétrica ($\varepsilon$, que é adimensional) do solvente no qual as interações ocorrem:

$$F = \frac{Q_1 Q_2}{\varepsilon r^2}$$

Para a água a 25°C, $\varepsilon$ é 78,5, e para o solvente fortemente apolar benzeno, $\varepsilon$ é 4,6. Portanto, as interações iônicas entre os íons dissolvidos são muito mais fortes em ambiente menos polar. A dependência do $r^2$ é tal que a atração ou repulsão iônica opera somente em pequenas distâncias – na faixa de 10 a 40 nm (dependendo da concentração do eletrólito) quando o solvente é a água.

**TABELA 2-2** Alguns exemplos de biomoléculas polares, apolares e anfipáticas (mostradas nas suas formas ionizadas em pH 7)

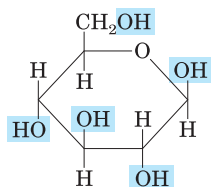
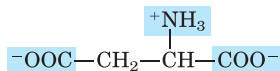
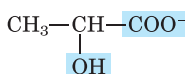
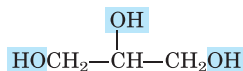
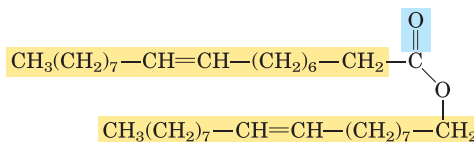
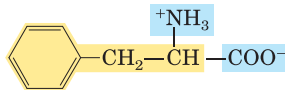
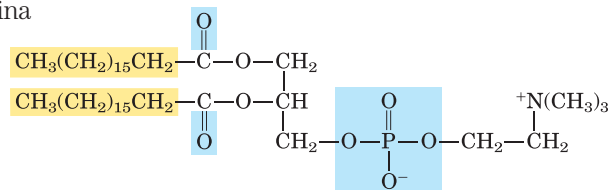
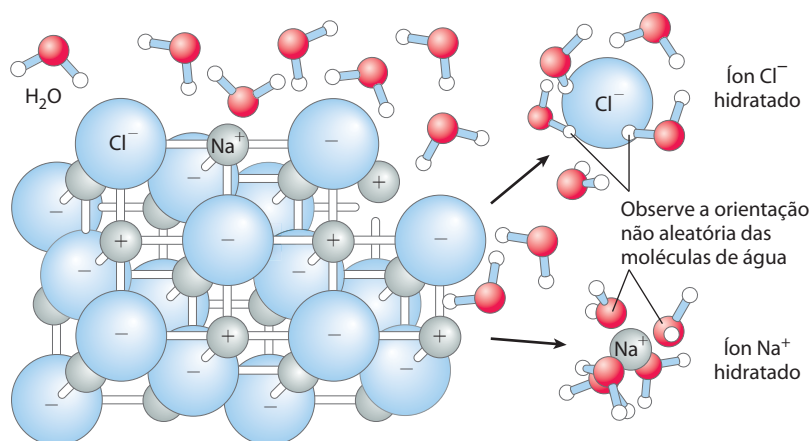



**FIGURA 2-6 A água como solvente.** A água dissolve muitos sais cristalinos pela hidratação de seus íons. A rede cristalina do NaCl é desfeita quando as moléculas de água se aglomeram ao redor dos íons $Cl^-$ e $Na^+$. As cargas iônicas são parcialmente neutralizadas, e as atrações eletrostáticas necessárias para a formação da rede são enfraquecidas.

## A entropia aumenta quando uma substância cristalina se dissolve

Logo que um sal como o NaCl se dissolve, os íons $Na^+$ e $Cl^-$ abandonam a rede cristalina e adquirem uma liberdade muito maior de movimento (Figura 2-6). O aumento resultante na entropia do sistema (grau de desordem) é em grande parte responsável pela facilidade da dissolução dos sais como NaCl em água. Em termos termodinâmicos, a formação de uma solução ocorre com uma variação favorável de energia livre: $\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S$, onde o $\Delta H$ tem baixo valor positivo e o $T - S$ tem alto valor positivo; assim, o $\Delta G$ é negativo.

## Gases apolares são fracamente solúveis em água

As moléculas de gases biologicamente importantes como $CO_2$, $O_2$ e $N_2$ são apolares. No caso de $O_2$ e $N_2$, os elétrons são compartilhados igualmente por ambos os átomos da ligação. No $CO_2$, cada ligação C═O é polar, mas os dois dipolos estão em direções antagônicas e anulam um ao outro (Tabela 2-3). A adição de moléculas da fase gasosa desordenada em uma solução aquosa restringe o movimento do gás e das moléculas de água e, portanto, representa um decréscimo de entropia. A combinação entre a natureza apolar desses gases e o decréscimo de entropia quando eles entram na solução os tornam muito pouco solúveis em água (Tabela 2-3). Alguns organismos têm "proteínas transportadoras" solúveis em água (p. ex., hemoglobina e mioglobina) que facilitam o transporte de $O_2$. O dióxido de carbono forma o ácido carbônico ($H_2CO_3$) em solução aquosa, que é transportado tanto como íon bicarbonato ($HCO_3^-$), como o íon bicarbonato livre solúvel em água (~100 g/L a 25°C) e ligado à hemoglobina. Três outros gases, $NH_3$, NO e $H_2S$, também têm papéis biológicos em alguns organismos; esses gases são polares, se dissolvem facilmente em água e ionizam em solução aquosa.

## Compostos apolares forçam mudanças energeticamente desfavoráveis na estrutura da água

Quando a água é misturada com benzeno ou hexano, são formadas duas fases; nenhum dos líquidos é solúvel no outro. Compostos apolares como benzeno e hexano são hidrofóbicos – incapazes de fazerem interações energeticamente favoráveis com moléculas de água, podendo interferir com as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água. Todas as moléculas ou íons em solução aquosa

**TABELA 2-3** Solubilidade de alguns gases na água

| Gás | Estrutura* | Polaridade | Solubilidade em água (g/L)† |
|---|---|---|---|
| Nitrogênio | N≡N | Apolar | 0,018 (40°C) |
| Oxigênio | O═O | Apolar | 0,035 (50°C) |
| Dióxido de carbono | δ– ← O═C═O → δ– | Apolar | 0,097 (45°C) |
| Amônia | H, H, H ligados a N (↓ δ–) | Polar | 900 (10°C) |
| Sulfeto de hidrogênio | H, H ligados a S (↓ δ–) | Polar | 1.860 (40°C) |

*As setas representam os dipolos elétricos; existe uma carga parcial negativa ($\delta^-$) na ponta da seta, e uma carga parcial positiva ($\delta^+$; não mostrado aqui) na outra extremidade.
†Observe que as moléculas polares dissolvem melhor, mesmo em temperaturas baixas, que as moléculas apolares em temperaturas relativamente altas.

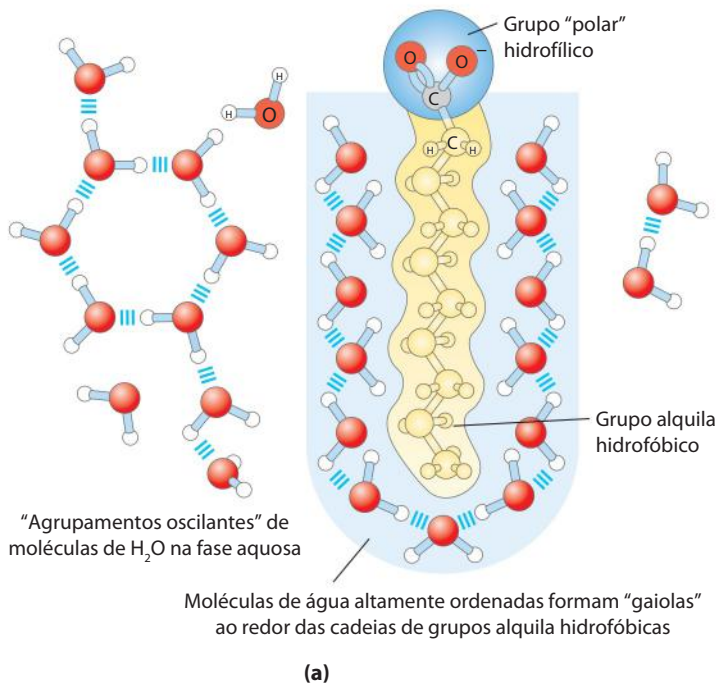
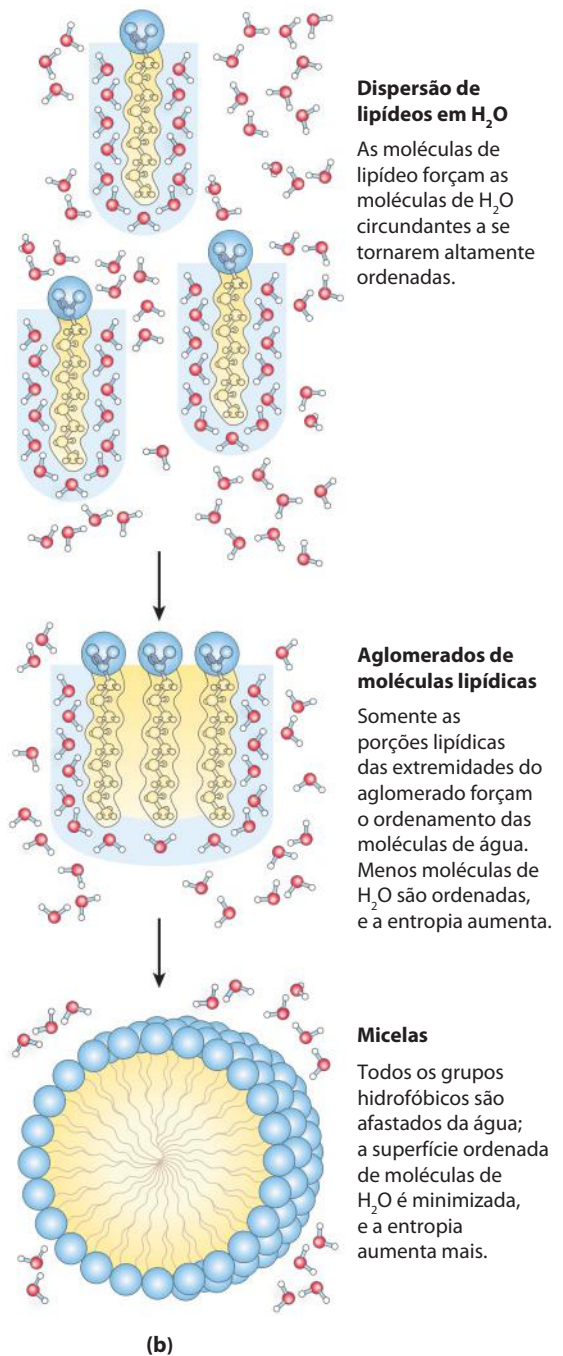



**FIGURA 2-7 Compostos anfipáticos em solução aquosa. (a)** Ácidos graxos de cadeia longa têm cadeias de grupos alquila muito hidrofóbicas, cada qual envolta por uma camada de moléculas de água altamente ordenadas. **(b)** Pela aglomeração conjunta em micelas, as moléculas de ácidos graxos expõem a menor área superficial possível na água, e menos moléculas de água serão necessárias na camada de água ordenada. A energia ganha pela liberação das moléculas de água até então imobilizadas estabiliza a micela.

interferem com as ligações de hidrogênio de algumas moléculas de água nas suas vizinhanças, mas solutos polares ou carregados (como NaCl) compensam as interações de hidrogênio água-água perdidas pela formação de novas interações água-soluto. A variação líquida em entalpia ($\Delta H$) para a dissolução desses solutos geralmente é pequena. Solutos hidrofóbicos, entretanto, não oferecem essa compensação, e a sua adição à água pode resultar em um pequeno ganho de entalpia; a quebra das ligações de hidrogênio entre as moléculas de água retira energia do sistema requerendo a entrada de energia das vizinhanças. Além da entrada de energia necessária, a dissolução dos compostos hidrofóbicos em água produz um decréscimo mensurável na entropia. As moléculas de água na vizinhança imediata de um soluto apolar são restringidas nas suas possíveis orientações já que formam um envoltório altamente ordenado no formato de gaiola ao redor de cada molécula do soluto. Essas moléculas de água não estão altamente orientadas como aquelas em **clatratos**, compostos cristalinos de solutos apolares e água, mas o efeito é o mesmo em ambos os casos: o ordenamento das moléculas de água reduz a entropia. O número de moléculas de água ordenadas e, portanto, a magnitude da redução da entropia são proporcionais à área da superfície do soluto hidrofóbico retido dentro da gaiola de moléculas de água. A variação de energia livre para a dissolução de um soluto apolar é, portanto, desfavorável: $\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S$, onde $\Delta H$ tem valor positivo, $\Delta S$ tem valor negativo e $\Delta G$ é positivo.

Compostos **anfipáticos** contêm regiões polares (ou carregadas) e regiões apolares (Tabela 2-2). Quando um composto anfipático é misturado com água, a região polar hidrofílica interage favoravelmente com a água e tende a se dissolver, mas a região apolar hidrofóbica tende a evitar contato com a água (**Figura 2-7a**). As regiões apolares das moléculas se aglomeram para apresentar a menor área hidrofóbica possível ao solvente aquoso, e as regiões polares são arranjadas de forma a maximizar suas interações com o solvente (Figura 2-7b). Essas estruturas estáveis de compostos anfipáticos em água, chamados de **micelas**, podem conter centenas ou milhares de moléculas. As forças que mantêm as regiões apolares das moléculas unidas são chamadas de

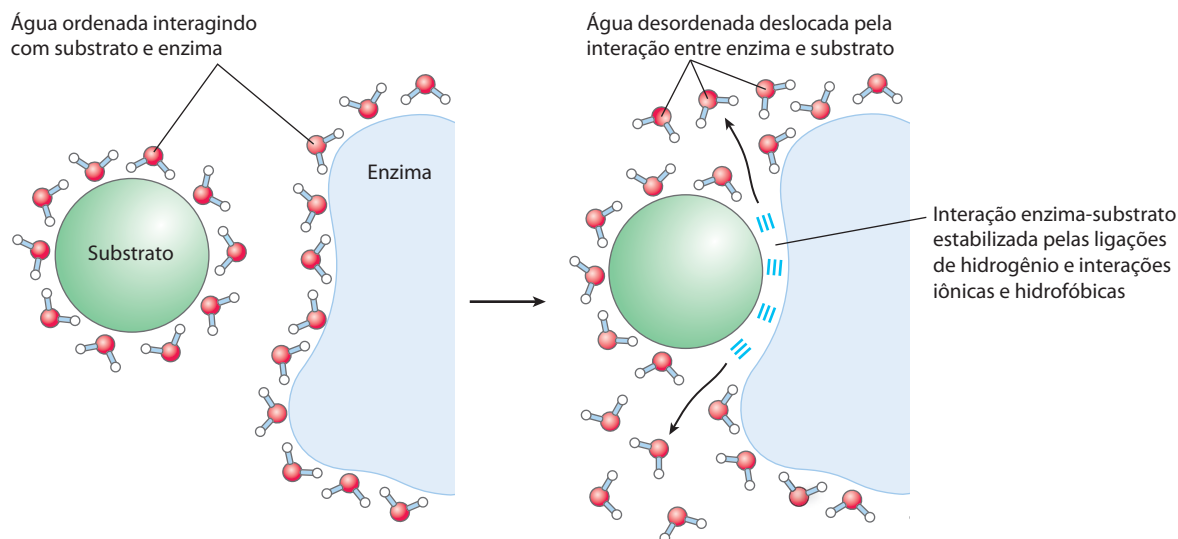



**FIGURA 2-8 A liberação de água ordenada favorece a formação de um complexo enzima-substrato.** A enzima e o substrato, quando separados, forçam as moléculas de água vizinhas a formar uma camada ordenada. A ligação do substrato com a enzima libera algumas dessas águas ordenadas, e o aumento resultante na entropia favorece termodinamicamente a formação do complexo enzima-substrato (ver p. 198).

**interações hidrofóbicas**. A força das interações hidrofóbicas não é decorrente de nenhuma atração intrínseca entre as partes apolares. Em parte, é resultado da maior estabilidade termodinâmica que o sistema atinge pela minimização do número de moléculas de água requeridas para envolver as porções hidrofóbicas das moléculas de soluto.

Muitas biomoléculas são anfipáticas; proteínas, pigmentos, certas vitaminas e os esteroides e fosfolipídeos de membranas apresentam regiões polares e apolares. As estruturas formadas por essas moléculas são estabilizadas por interações hidrofóbicas entre as regiões apolares. As interações hidrofóbicas entre os lipídeos, e entre lipídeos e proteínas, são as mais importantes na determinação da estrutura de membranas biológicas. Interações hidrofóbicas entre aminoácidos apolares também estabilizam as estruturas tridimensionais das proteínas.

As ligações de hidrogênio entre a água e os solutos polares também causam um ordenamento das moléculas de água, mas o efeito energético é menos significativo que com solutos apolares. A ruptura de moléculas de água ordenadas é parte da força motriz para a ligação de um substrato polar (reagente) a uma superfície polar complementar de uma enzima: a entropia aumenta quando a enzima desloca moléculas de água ordenadas do substrato, e o substrato desloca moléculas de água ordenadas da superfície da enzima (**Figura 2-8**).

## As interações de van der Waals são atrações interatômicas fracas

Quando dois átomos não carregados são colocados bem próximos um do outro, as suas nuvens eletrônicas influenciam uma a outra. Variações aleatórias nas posições dos elétrons ao redor do núcleo podem criar um dipolo transitório elétrico, que induz à formação de um dipolo transiente de carga oposta no átomo mais próximo a ele. Os dois dipolos atraem-se fracamente um ao outro, aproximando os dois núcleos. Essas atrações fracas são chamadas de **interações de van der Waals** (também conhecidas como **forças de London**). À medida que os dois núcleos se aproximam, as nuvens eletrônicas começam a repelir uma a outra. Nesse ponto no qual a atração líquida é máxima, diz-se que o núcleo está em contato de van der Waals. Cada átomo tem um **raio de van der Waals** característico, uma medida do quão próximo um átomo permite que outro se aproxime (Tabela 2-4). No caso dos modelos moleculares de volume atômico mostrados nesse livro, os átomos estão representados em tamanhos proporcionais aos seus raios de van der Waals.

**TABELA 2-4** Raios de van der Waals e raios covalentes (ligação simples) de alguns elementos

| Elementos | Raio de van der Waals (nm) | Raio covalente para ligações simples (nm) |
|---|---|---|
| H | 0,11 | 0,030 |
| O | 0,15 | 0,066 |
| N | 0,15 | 0,070 |
| C | 0,17 | 0,077 |
| S | 0,18 | 0,104 |
| P | 0,19 | 0,110 |
| I | 0,21 | 0,133 |

**Fontes**: Para os raios de van der Waals: Chauvin, R. (1992). Explicit periodic trend on van der Waals Radii. *J. Phys. Chem.* 96, 9194-9197. Para os raios covalentes: Pauling, L. (1960). *Nature of the Chemical Bond*, 3rd edn, Cornell University Press, Ithaca NY.

**Nota**: Os raios de van der Waals descrevem as dimensões de volume atômico dos átomos. Quando dois átomos estão ligados covalentemente, os raios atômicos no ponto da ligação são menores que os raios de van der Waals, porque os átomos unidos são aproximados pelo par de elétrons compartilhados. A distância entre os núcleos em uma interação de van der Waals ou uma ligação covalente é aproximadamente igual à soma dos raios de van der Waals ou covalentes, respectivamente, para os dois átomos. Portanto, o comprimento de uma ligação carbono-carbono simples é de cerca de 0,077 nm + 0,077 nm = 0,154 nm.

## Interações fracas são cruciais para a estrutura e a função das macromoléculas

> "À medida que os métodos da química estrutural forem aplicados em problemas fisiológicos, eu acredito, será descoberto que a importância das ligações de hidrogênio para a fisiologia é maior do que qualquer outra característica estrutural."
>
> —*Linus Pauling*
> A natureza das ligações químicas, 1939

As interações não covalentes descritas – ligações de hidrogênio e interações iônicas, hidrofóbicas e de van der Waals (Tabela 2-5) – são muito mais fracas que as ligações covalentes. É necessário o fornecimento de 350 kJ de energia para quebrar um mol ($6 \times 10^{23}$) de ligações simples do tipo C—C, e cerca de 410 kJ de energia para quebrar um mol de ligações C—H, mas uma quantidade pequena como 4 kJ é suficiente para romper um mol de interações típicas de van der Waals. As interações hidrofóbicas são também muito mais fracas que as ligações covalentes, embora elas sejam substancialmente fortalecidas por um solvente altamente polar (p. ex., solução salina concentrada). Interações iônicas e ligações de hidrogênio são variáveis em força, dependendo da polaridade do solvente e do alinhamento dos átomos ligados ao hidrogênio, mas são sempre muito mais fracas que as ligações covalentes. Em solvente aquoso a 25°C, a energia térmica disponível pode ser da mesma ordem de grandeza que a força dessas interações fracas, e as interações entre as moléculas de soluto e solvente (água) são quase tão favoráveis quanto as interações soluto-soluto. Consequentemente, ligações de hidrogênio e interações iônicas, hidrofóbicas e de van der Waals estão continuamente se formando e quebrando.

**TABELA 2-5** Os quatro tipos de interações não covalentes ("fracas") entre biomoléculas em solvente aquoso

| | |
|---|---|
| Ligações de hidrogênio | |
| Entre grupos neutros | $>C{=}O \cdots H{-}O{-}$ |
| Entre ligações peptídicas | $>C{=}O \cdots H{-}N<$ |
| Interações iônicas | |
| Atração | $-{}^{+}NH_3 \rightarrow\leftarrow {}^{-}O{-}C(=O){-}$ |
| Repulsão | $-{}^{+}NH_3 \longleftrightarrow H_3N^{+}-$ |
| Interações hidrofóbicas | Água; $CH_3$ $CH_3$ / CH / $CH_2$; $CH_2$ (anel benzênico) |
| Interações de van der Waals | Dois átomos quaisquer bem próximos um do outro |

Apesar de esses quatro tipos de interações serem individualmente fracos em relação às ligações covalentes, o efeito cumulativo de muitas interações desse tipo pode ser muito significativo. Por exemplo, a ligação não covalente de uma enzima a um substrato pode envolver muitas ligações de hidrogênio e uma ou mais interações iônicas, assim como interações hidrofóbicas e de van der Waals. A formação de cada uma dessas ligações fracas contribui para um decréscimo líquido de energia livre do sistema. É possível calcular a estabilidade de uma interação não covalente, como a das ligações de hidrogênio de uma molécula pequena com uma macromolécula, a partir da energia de ligação, a redução na energia do sistema quando a ligação ocorre. A estabilidade, como medida pela constante de equilíbrio da reação da ligação (ver a seguir), varia *exponencialmente* com a energia de ligação. Para desassociar duas biomoléculas (como enzima e substrato) que são associadas de forma não covalente por meio de múltiplas interações fracas, todas essas interações devem ser rompidas ao mesmo tempo. Devido ao fato de as interações flutuarem aleatoriamente, tais rupturas simultâneas são bem improváveis. Portanto, 5 ou 20 interações fracas concedem muito maior estabilidade molecular em relação ao que poderia se esperar intuitivamente a partir de uma simples soma de todas as energias de ligação pequenas.

Macromoléculas como proteínas, DNA e RNA contêm tantos sítios potenciais para ligações de hidrogênio ou interações iônicas, de van der Waals ou hidrofóbicas que os efeitos cumulativos dessas forças de ligação de menor ordem podem ser enormes. Para macromoléculas, a estrutura mais estável (ou seja, a nativa) em geral é aquela em que as interações fracas são maximizadas. O enovelamento de um único polipeptídeo ou uma cadeia polinucleotídica em sua forma tridimensional é determinado por esse princípio. A ligação de um antígeno a um anticorpo específico depende dos efeitos cumulativos de muitas interações fracas. Como observado anteriormente, a energia liberada quando uma enzima se liga não covalentemente ao seu substrato é a principal fonte do poder catalítico da enzima. A ligação de um hormônio ou um neurotransmissor ao seu receptor proteico celular é o resultado de múltiplas interações fracas. Uma consequência do grande tamanho de enzimas e receptores (em relação aos substratos e ligantes) é que suas grandes superfícies geram muitas oportunidades para a formação de interações fracas. No nível molecular, a complementaridade da interação entre as biomoléculas reflete a complementaridade e as forças de natureza fraca entre grupos polares, carregados e hidrofóbicos na superfície das moléculas.

Quando a estrutura de uma proteína como a hemoglobina (**Figura 2-9**) é determinada por cristalografia (ver Quadro 4-5), moléculas de água são com frequência encontradas tão fortemente ligadas que fazem parte da estrutura do cristal; o mesmo é verdadeiro para a água em cristais de RNA ou DNA. Essas moléculas de água ligadas, que podem também ser detectadas em soluções aquosas por ressonância magnética nuclear, têm propriedades bem diferentes daquelas das moléculas da massa do solvente. Elas não são, por exemplo, osmoticamente ativas (ver a seguir). Para muitas proteínas, a presença de moléculas de água fortemente ligadas é essen-

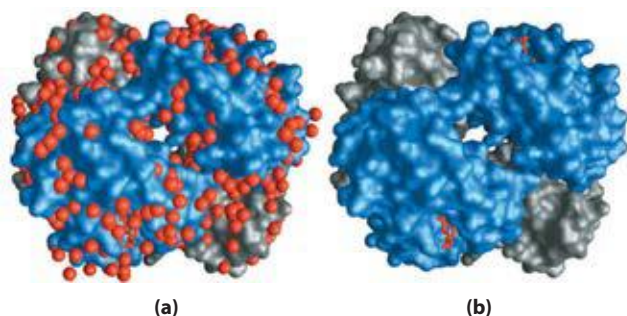



**FIGURA 2-9 Ligação da água na hemoglobina.** (PDB ID 1A3N) A estrutura cristalina da hemoglobina, mostrada **(a)** com moléculas de água ligadas (esferas vermelhas) e **(b)** sem as moléculas de água. As moléculas de água estão ligadas tão firmemente que afetam o padrão de difração de raios X, apesar de serem partes fixas do cristal. As duas subunidades $\alpha$ da hemoglobina estão mostradas em cinza, e as duas subunidades $\beta$ em azul. Cada subunidade tem um grupo heme ligado (estrutura em bastão vermelho), visível somente nas subunidades $\beta$ nesta visualização. A estrutura e a função da hemoglobina são discutidas em detalhes no Capítulo 5.

**FIGURA 2-10 Cadeias de água no citocromo *f*.** A água é ligada em um canal de prótons da proteína de membrana citocromo *f*, que é parte da maquinaria de fixação de energia da fotossíntese em cloroplastos (ver Figura 19-61). Cinco moléculas de água estão unidas por ligações de hidrogênio umas às outras e aos grupos funcionais da proteína: os átomos da cadeia peptídica de resíduos de valina, prolina, arginina e alanina, e os grupos laterais de três resíduos de asparagina e dois resíduos de glutamina. A proteína tem um grupo heme ligado (ver Figura 5-1), e o íon ferro desse grupo facilita o fluxo de elétrons durante a fotossíntese. O fluxo de elétrons é acoplado ao movimento dos prótons pela membrana, o que provavelmente envolve "saltos de prótons" (ver Figura 2-14) por essa cadeia de moléculas de água ligadas.

cial para a sua função. Na reação-chave da fotossíntese, por exemplo, prótons correm através de uma membrana biológica na medida em que a luz direciona o fluxo de elétrons por uma série de proteínas transportadoras de elétrons (ver Figura 19-62). Uma dessas proteínas, o citocromo *f*, tem uma cadeia de cinco moléculas de água ligada (**Figura 2-10**) que pode fornecer um caminho para os prótons se moverem através da membrana por um processo chamado de "salto de prótons" (descrito a seguir). Outra bomba de prótons movida pela luz, a bacteriorrodopsina, usa uma cadeia de moléculas de água precisamente orientadas no movimento de prótons através da membrana (Figura 19-69b). Moléculas de hidrogênio fortemente ligadas também podem formar uma parte essencial do sítio de ligação de uma proteína com suas moléculas. Na proteína arabinose bacterial-ligante, por exemplo, cinco moléculas de água formam ligações de hidrogênio que fornecem ligações cruzadas críticas entre o açúcar (arabinose) e os resíduos de aminoácido no local de ligação do açúcar (**Figura 2-11**).

## Solutos afetam as propriedades coligativas de soluções aquosas

Solutos de todos os tipos modificam algumas propriedades físicas do solvente, a água: a pressão de vapor, o ponto de ebulição e de fusão (ponto de congelamento) e a pressão osmótica. São chamadas de **propriedades coligativas** ("associadas"), porque o efeito de solutos nas quatro propriedades tem o mesmo princípio: a concentração da água é mais baixa nas soluções do que na água pura. O efeito da concentração do soluto nas propriedades coligativas da água é independente das propriedades químicas do soluto, dependendo somente do *número* de partículas de soluto (moléculas, íons) para uma dada quantidade de água. Por exemplo, um composto como o NaCl, que se dissocia em solução, tem um efeito na pressão osmótica duas vezes maior que o número de moléculas de um soluto não dissociado como a glicose.

**FIGURA 2-11 Água unida por ligação de hidrogênio como parte do sítio de ligação do açúcar a uma proteína.** Na proteína ligante L-arabinose da bactéria *E. Coli*, cinco moléculas de água são componentes essenciais na rede de ligações de hidrogênio entre o açúcar arabinose (centro) e no mínimo 13 resíduos de aminoácidos no local de ligação do açúcar. Visto em três dimensões, esses três grupos de interações constituem duas camadas de semiconexões; resíduos de aminoácidos na primeira camada são marcados em vermelho, na segunda camada em verde. Algumas ligações de hidrogênio são desenhadas mais longas que outras por clareza; elas não são mais longas que as outras na realidade.

As moléculas de água tendem a se mover de uma região de maior concentração de água para uma de menor concentração, de acordo com a tendência na natureza para um sistema se tornar desordenado. Quando duas soluções aquosas são separadas por uma membrana semipermeável (que permite a passagem de água, mas não de moléculas de soluto), a difusão das moléculas de água da região de maior concentração para a região de menor concentração de água produz pressão osmótica (**Figura 2-12**). Pressão osmótica, $\Pi$, medida como a força necessária para resistir ao movimento da água (Figura 2-12c), é aproximada pela equação de van't Hoff:

$$\Pi = icRT$$

na qual $R$ é a constante dos gases e $T$ a temperatura absoluta. O símbolo $i$ é fator de van't Hoff, que é a medida de quanto de soluto se dissocia em duas ou mais espécies iônicas. O termo $ic$ é a **osmolaridade** da solução, o produto do fator de van't Hoff $i$ e a concentração molar do soluto $c$. Em soluções diluídas de NaCl, o soluto se dissocia completamente em $Na^+$ e $Cl^-$, dobrando o número de partículas de soluto, sendo portanto $i = 2$. Para todos solutos não ionizáveis, $i = 1$. Para soluções com vários ($n$) solutos, $\Pi$ é a soma da contribuição de cada espécie.

$$\Pi = RT\,(i_1c_1 + i_2c_2 + \ldots + i_nc_n)$$

**Osmose**, o movimento da água através de uma membrana semipermeável ocasionado por diferenças na pressão osmótica, é um fator importante na vida de grande parte das células. As membranas plasmáticas são mais permeáveis à água que a maioria das outras moléculas pequenas, íons e macromoléculas, porque os canais proteicos (aquaporinas; ver Figura 11-45) na membrana seletivamente permitem a passagem de água. Soluções com osmolaridade igual à do citosol de uma célula são ditas **isotônicas** em relação àquela célula. Circundada por uma solução isotônica, uma célula nunca ganha ou perde água (**Figura 2-13**). Em soluções **hipertônicas** (com maior osmolaridade que o citosol), a célula encolhe assim que a água se transfere para fora. Em soluções **hipotônicas** (com menor osmolaridade que o citosol), a célula incha assim que a água entra. Nos seus ambientes naturais, as células geralmente contêm maior concentração de biomoléculas e íons que nas suas vizinhanças, logo a pressão osmótica tende a enviar a água para dentro das células. Se não estiver de alguma forma contrabalançada, essa invasão de água para dentro das células pode distender a membrana plasmática e no final causar o rompimento celular (osmólise).

Muitos mecanismos estão envolvidos na prevenção dessa catástrofe. Em bactérias e plantas, a membrana plasmática é envolvida por uma parede de célula não expansível com rigidez e força suficientes para resistir à pressão osmótica e prevenir a osmólise. Alguns protistas de água doce que vivem em meio altamente hipotônico têm uma organela (vacúolo contrátil) que bombeia a água para fora da célula. Em animais multicelulares, o plasma sanguíneo e os fluidos intersticiais (o fluido extracelular dos tecidos)

**FIGURA 2-12 Osmose e a medida da pressão osmótica.** **(a)** O estado inicial. O tubo contém uma solução aquosa, o béquer contém água pura, e a membrana semipermeável permite a passagem de água, mas não de soluto. A água flui a partir do béquer para dentro do tubo para equalizar a sua concentração através da membrana. **(b)** O estado final. A água se moveu para a solução do composto não permeante, diluiu-o e aumentou o nível de água na coluna dentro do tubo. No equilíbrio, a força da gravidade que atua sobre a solução do tubo equilibra a tendência da água de se mover para dentro do tubo, onde sua concentração é menor. **(c)** A pressão osmótica (Π) é medida como a força que deve ser aplicada para que a solução no tubo retorne ao nível que estava no béquer. Essa força é proporcional à altura, *h*, da coluna em (b).

**FIGURA 2-13 Efeito da osmolaridade extracelular no movimento da água através de uma membrana plasmática.** Quando uma célula em balanço osmótico com o meio circundante – isto é, uma célula em **(a)** um meio isotônico – é transferida para **(b)** uma solução hipertônica ou **(c)** uma solução hipotônica, a água tende a se mover através da membrana na direção que deve igualar a osmolaridade nos lados externo e interno da célula.

são mantidos em osmolaridade semelhante à do citosol. A alta concentração de albumina e outras proteínas no plasma sanguíneo contribuem para a sua osmolaridade. As células também bombeiam ativamente para fora $Na^+$ e outros íons para o fluido intersticial para que permaneça o equilíbrio osmótico com o meio circundante.

Como o efeito dos solutos na osmolaridade depende do *número* de partículas dissolvidas, e não da sua *massa*, as macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos) têm efeito muito menor na osmolaridade de uma solução que teria uma massa equivalente dos seus componentes monoméricos. Por exemplo, um *grama* de um polissacarídeo composto por 1.000 unidades de glicose tem o mesmo efeito na osmolaridade que um *miligrama* de glicose. O armazenamento de energia na forma de polissacarídeos (amido ou glicogênio) em vez de glicose ou outros açúcares simples evita um grande aumento na pressão osmótica nas células de armazenamento.

As plantas usam a pressão osmótica para atingir a rigidez mecânica. A alta concentração de soluto nos vacúolos das células da planta arrasta água para dentro das células (Figura 2-13), mas a parede celular não é expansível e previne o inchamento; em vez disso, a pressão exercida contra a parede celular (pressão de turgor) aumenta, enrijecendo a célula, o tecido e o corpo da planta. A alface da sua salada murcha devido à perda de água que reduziu a pressão de turgor. A osmólise também tem consequências em protocolos de laboratório. Mitocôndrias, cloroplastos e lisossomos, por exemplo, estão revestidos por membranas semipermeáveis. Ao isolar essas organelas a partir de células rompidas, os bioquímicos devem fazer os fracionamentos em soluções isotônicas (ver Figura 1-8) para prevenir entrada de água excessiva para dentro das organelas, podendo causar o inchamento e, por conseguinte, o rompimento. Tampões usados em fracionamento geralmente contêm concentrações suficientes de sacarose ou algum outro soluto inerte para proteger as organelas da osmólise.

**PROBLEMA RESOLVIDO 2-1** **Força osmótica de uma organela I**

Suponha que os principais solutos dos lisossomos intactos são KCl (~0,1 M) e NaCl (~0,03 M). Ao isolar os lisossomos, qual concentração de sacarose é requerida na solução externa em temperatura ambiente (25°C) para prevenir o inchamento e a lise das organelas?

**Solução:** É preciso encontrar a concentração de sacarose que resulta em uma força osmótica igual à produzida pelos sais KCl e NaCl dentro dos lisossomos. A equação para calcular a força osmótica (a equação de van't Hoff) é:

$$\Pi = RT\ (i_1c_1 + i_2c_2 + i_3c_3 + \ldots + i_nc_n)$$

na qual $R$ é a constante dos gases 8,315 J/mol · K, $T$ é a temperatura absoluta (Kelvin), $c_1$, $c_2$ e $c_3$ são as concentrações molares de cada soluto, e $i_1$, $i_2$ e $i_3$ são os números de partículas de cada soluto em solução ($i$ = 2 para KCl e NaCl).

A pressão osmótica do conteúdo do lisossomo é:

$$\begin{aligned}\Pi_{\text{lisossomo}} &= RT\ (i_{\text{KCl}}c_{\text{KCl}} + i_{\text{NaCl}}c_{\text{NaCl}}) \\ &= RT\ [(2)(0{,}1\ \text{mol/L}) + (2)(0{,}03\ \text{mol/L})] \\ &= RT\ (0{,}26\ \text{mol/L})\end{aligned}$$

A pressão osmótica de uma solução de sacarose é dada por:

$$\Pi_{\text{sacarose}} = RT\ (i_{\text{sacarose}}c_{\text{sacarose}})$$

Nesse caso, $i_{\text{sacarose}} = 1$, porque a solução de sacarose não se ioniza. Portanto,

$$\Pi_{\text{sacarose}} = RT\ (c_{\text{sacarose}})$$

A força osmótica do conteúdo do lisossomo é igual à da solução de sacarose quando:

$$\begin{aligned}\Pi_{\text{sacarose}} &= \Pi_{\text{lisossomo}} \\ RT(c_{\text{sacarose}}) &= RT\ (0{,}26\ \text{mol/L}) \\ c_{\text{sacarose}} &= 0{,}26\ \text{mol/L}\end{aligned}$$

Assim, a concentração necessária de sacarose (*m*mol 342) é (0,26 mol/L) (342 g/mol)= 88,92 g/L. Usando a precisão de um algarismo significativo para a concentração do soluto, $c_{\text{sacarose}}$=0,09 kg/L.

**PROBLEMA RESOLVIDO 2-2** **Força osmótica de uma organela II**

Suponha que se decida usar uma solução de um polissacarídeo, como o glicogênio (ver p. 255), para equilibrar a pressão osmótica dos lisossomos (descritos no Problema Resolvido 2-1). Considerando um polímero linear de 100 unidades de glicose, calcule a quantidade desse polímero necessária para atingir a mesma pressão osmótica da solução de sacarose do Problema 2-1. A $M_r$ do polímero de glicose é ~18.000 e, como a sacarose, não se ioniza em solução.

**Solução:** Como obtido no Problema Resolvido 2-1,

$$\Pi_{\text{sacarose}} = RT\ (0{,}26\ \text{mol/L})$$

Da mesma forma,

$$\Pi_{\text{glicogênio}} = RT\ (i_{\text{glicogênio}}c_{\text{glicogênio}}) = RT\ (c_{\text{glicogênio}})$$

Para uma solução de glicogênio com força osmótica igual à da solução de sacarose,

$$\begin{aligned}\Pi_{\text{glicogênio}} &= \Pi_{\text{sacarose}} \\ RT\ (c_{\text{glicogênio}}) &= RT\ (0{,}26\ \text{mol/L}) \\ c_{\text{glicogênio}} &= 0{,}26\ \text{mol/L} = (0{,}26\ \text{mol/L})(18.000\ \text{g/mol}) \\ &= 4{,}68\ \text{kg/L}\end{aligned}$$

Ou, considerando algarismos significativos, $c_{\text{glicogênio}}$= 5 kg/L, uma concentração absurdamente alta.

Como será visto mais adiante (p. 256), células do fígado e do músculo armazenam carboidratos não na forma de açúcares de baixa massa molecular, como glicose ou sacarose, mas na forma de glicogênio, polímero de alta massa molecular. Isso permite que uma célula contenha maior massa de glicogênio com mínimo efeito na osmolaridade do citosol.

## RESUMO 2.1 Interações fracas em sistemas aquosos

- A diferença entre a eletronegatividade do H e a do O torna a água uma molécula muito polar, capaz de formar ligações de hidrogênio entre suas moléculas e com solutos. As ligações de hidrogênio são curtas, basicamente eletrostáticas e mais fracas que as ligações covalentes. A água é um bom solvente para solutos polares

(hidrofílicos), com os quais forma ligações de hidrogênio, e para solutos carregados, com os quais forma interações eletrostáticas.

- Compostos apolares (hidrofóbicos) se dissolvem fracamente em água; eles não formam ligações de hidrogênio com o solvente, e a sua presença força um ordenamento energeticamente desfavorável de moléculas de água nas suas superfícies hidrofóbicas. Para minimizar a superfície exposta à água, os compostos apolares como os lipídeos formam agregados (micelas) nos quais as porções hidrofóbicas são sequestradas no seu interior, associando-se por meio de interações hidrofóbicas, e somente a parte mais polar interage com a água.
- Interações fracas e não covalentes, em grande número, influenciam decisivamente o enovelamento de macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos. As conformações mais estáveis são aquelas nas quais as ligações de hidrogênio são maximizadas dentro da molécula e entre a molécula e o solvente, e nas quais as partes hidrofóbicas se agregam no interior das moléculas, longe do solvente aquoso.
- As propriedades físicas das soluções aquosas são fortemente influenciadas pelas concentrações dos solutos. Quando dois compartimentos aquosos são separados por uma membrana semipermeável (como a membrana plasmática que separa uma célula do seu meio), a água se move através da membrana para igualar a osmolaridade nos dois compartimentos. Essa tendência da água em se mover através de uma membrana semipermeável produz a pressão osmótica.

## 2.2 Ionização da água e de ácidos e bases fracas

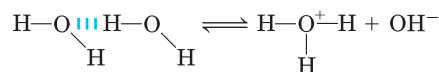
Embora muitas das propriedades de solvente da água possam ser explicadas em termos da molécula de água não carregada, o pequeno grau de ionização da água em seus íons ($H^+$) e ($OH^-$) deve também ser levado em consideração. Como todas as reações reversíveis, a ionização da água pode ser descrita por uma constante de equilíbrio. Quando ácidos fracos são dissolvidos na água, eles contribuem com um $H^+$ por ionização; bases fracas consomem um $H^+$ se tornando protonadas. Esses processos também são governados por constantes de equilíbrio. A concentração total dos íons hidrogênio a partir de todas as fontes é experimentalmente mensurável, sendo expressa como o pH da solução. Para predizer o estado de ionização de solutos na água, devem-se considerar as constantes de equilíbrio relevantes para cada reação de ionização. Por isso, será feita uma breve discussão sobre a ionização da água e de ácidos e bases fracas dissolvidas em água.

### A água pura é levemente ionizada

As moléculas de água têm a leve tendência de sofrer uma ionização reversível, produzindo um íon hidrogênio (próton) e um íon hidróxido, gerando o equilíbrio:

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH \qquad (2\text{-}1)$$

Apesar de geralmente se mostrar o produto de dissociação da água como $H^+$, os prótons livres não existem em solução; os íons hidrogênio formados em água são imediatamente hidratados para formar **íons hidrônio** ($H_3O^+$). As ligações de hidrogênio entre as moléculas de água fazem com que a hidratação dos prótons dissociados seja praticamente instantânea:

$$\mathrm{H{-}\underset{\backslash H}{O} \cdots H{-}\underset{\backslash H}{O}} \rightleftharpoons \mathrm{H{-}\underset{|\,H}{\overset{+}{O}}{-}H} + \mathrm{OH^-}$$

A ionização da água pode ser medida pela sua condutividade elétrica; a água pura carrega corrente elétrica enquanto o $H_3O^+$ migra para o cátodo e $OH^-$ para o ânodo. O movimento dos íons hidrônio e hidróxido no campo elétrico é extremamente rápido comparado com o de outros íons como $Na^+$, $K^+$ e $Cl^-$. Essa alta mobilidade iônica resulta do tipo de "salto de prótons" mostrado na **Figura 2-14**. Os prótons individuais não se movem para muito longe na solução, mas uma série de prótons salta entre as moléculas de água ligadas por hidrogênio e gera um movimento *líquido* de prótons por uma longa distância em um tempo extremamente curto. (OH também se move rapidamente por saltos, mas na direção oposta). Como resultado da alta mobilidade iônica do $H^+$, reações acidobásicas em soluções aquosas são excepcionalmente rápidas. Como observado anteriormente, o salto de pró-

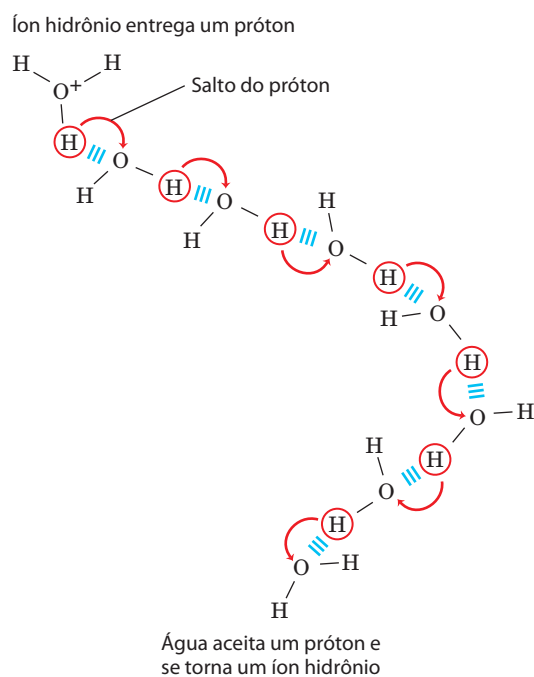



**FIGURA 2-14 Salto de prótons.** Pequenos "saltos" de prótons entre uma série de moléculas de água ligadas por hidrogênio resultam em um movimento líquido extremamente rápido de um próton em uma longa distância. Como o íon hidrônio (parte de cima, à esquerda) doa um próton, uma molécula de água a certa distância (à direita, inferior) adquire um, se tornando um íon hidrônio. O salto de prótons é muito mais rápido que a difusão verdadeira e explica a mobilidade iônica incrivelmente alta dos íons $H^+$ comparados com outros cátions monovalentes como $Na^+$ e $K^+$.

tons muito provavelmente exerce uma função nas reações biológicas de transferência de prótons (Figura 2-10; ver também Figura 19-69b).

Desde que a ionização reversível é crucial para o papel da água na função celular, deve haver meios de expressar a extensão da ionização da água em termos quantitativos. Uma breve revisão de algumas propriedades de reações químicas reversíveis mostra como isso pode ser feito.

A posição de equilíbrio de qualquer reação química é dada por sua **constante de equilíbrio**, $\boldsymbol{K_{eq}}$ (algumas vezes expressa simplesmente por $K$). Para a reação geral:

$$A + B \rightleftharpoons C + D \qquad (2\text{-}2)$$

a constante de equilíbrio $K_{eq}$ pode ser definida em termos da concentração dos reagentes (A e B) e dos produtos (C e D) no equilíbrio:

$$K_{eq} = \frac{[C]_{eq}[D]_{eq}}{[A]_{eq}[B]_{eq}}$$

Estritamente falando, os termos de concentração devem ser expressos como *atividades*, ou concentrações efetivas em soluções não ideais, de cada espécie. Exceto em trabalhos muito precisos, entretanto, a constante de equilíbrio pode ser aproximada pela medida das *concentrações* no equilíbrio. Por razões além do escopo desta discussão, as constantes de equilíbrio são adimensionais. Apesar disso, o texto continuará a utilizar as unidades de concentração (M) nas expressões da constante de equilíbrio usadas nesse livro para lembrá-los de que a molaridade é a unidade de concentração usada para o cálculo de $K_{eq}$.

A constante de equilíbrio é fixa e característica para qualquer dada reação química em uma temperatura específica. Ela define a composição final da mistura no equilíbrio, independentemente das concentrações iniciais dos reagentes e dos produtos. Inversamente, é possível calcular a constante de equilíbrio para uma dada reação em uma dada temperatura, se forem conhecidas as concentrações de equilíbrio de todos os reagentes e produtos. Como mostrado no Capítulo 1 (p. 26), a variação de energia livre padrão ($\Delta G°$) é diretamente relacionada ao ln $K_{eq}$.

## A ionização da água é expressa pela constante de equilíbrio

O grau de ionização da água no equilíbrio (Equação 2-1) é baixo; a 25°C somente duas entre $10^9$ moléculas na água pura são ionizadas a cada momento. A constante de equilíbrio para a ionização reversível da água é:

$$K_{eq} = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]} \qquad (2\text{-}3)$$

Na água pura a 25°C, a concentração de água é 55,5 M – gramas de $H_2O$ em 1 L divididas pela sua massa molecular grama: (1.000 g/L)/(18,015 g/mol) – sendo essencialmente constante em relação à concentração muito baixa de $H^+$ e $OH^-$, de $1 \times 10^{-7}$ M. Portanto, o valor de 55,5 M pode ser substituído na expressão da constante de equilíbrio (Equação 2-3), gerando:

$$K_{eq} = \frac{[H^+][OH^-]}{[55{,}5\ M]}$$

Rearranjando, isso se torna:

$$(55{,}5\ M)(K_{eq}) = [H^+][OH^-] = K_w \qquad (2\text{-}4)$$

onde $K_w$ designa o produto (55,5 M) ($K_{eq}$), que é o **produto iônico da água** a 25°C.

O valor para o $K_{eq}$, determinado por medidas de condutividade elétrica da água pura, é $1{,}8 \times 10^{-16}$ M a 25°C. Substituindo esse valor no $K_{eq}$ da Equação 2-4 tem-se o valor do produto iônico da água:

$$K_w = [H^+][OH^-] = (55{,}5\ M)(1{,}8 \times 10^{-16}\ M) = 1{,}0 \times 10^{-14}\ M^2$$

Assim, o produto $[H^+]$ $[OH^-]$ em solução aquosa a 25°C é sempre igual a $1 \times 10^{-14}$ $M^2$. Quando existem concentrações iguais de $H^+$ e de $OH^-$, como na água pura, diz-se que a solução está em **pH neutro**. Nesse pH, a concentração de $H^+$ e de $OH^-$ pode ser calculada a partir do produto iônico da água como se segue:

$$K_w = [H^+][OH^-] = [H^+]^2 = [OH^-]^2$$

Resolvendo para $[H^+]$ tem-se:

$$[H^+] = \sqrt{K_w} = \sqrt{1 \times 10^{-14}\ M^2}$$
$$[H^+] = [OH^-] = 10^{-7}\ M$$

Como o produto iônico da água é constante, quando $[H^+]$ é maior que $1 \times 10^{-7}$ M, a concentração de $[OH^-]$ deve ser menor que $1 \times 10^{-7}$ M, e vice-versa. Quando a concentração de $[H^+]$ é muito alta, como na solução de ácido clorídrico, a concentração de $[OH^-]$ deve ser bem baixa. A partir do produto iônico da água, pode-se calcular $[H^+]$ se for conhecida a concentração de $[OH^-]$, e vice-versa.

**PROBLEMA RESOLVIDO 2-3** **Cálculo de $[H^+]$**

Qual é a concentração de $H^+$ em uma solução de 0,1 M de NaOH?

**Solução:** Começa-se com a equação do produto iônico da água:

$$K_w = [H^+][OH^-]$$

Com $[OH^-]$ = 0,1 M, resolvendo para a $[H^+]$ tem-se:

$$[H^+] = \frac{K_w}{[OH^-]} = \frac{1 \times 10^{-14}\ M^2}{0{,}1\ M} = \frac{10^{-14}\ M^2}{10^{-1}\ M} = 10^{-13}\ M$$

**PROBLEMA RESOLVIDO 2-4** **Cálculo de $[OH^-]$**

Qual é a concentração de $OH^-$ em uma solução com uma concentração de $H^+$ de $1{,}3 \times 10^{-4}$ M?

**Solução:** Começa-se com a equação do produto iônico da água:

$$K_w = [H^+][OH^-]$$

Com $[H^+] = 1,3 \times 10^{-4}$ M, resolvendo para a $[OH^-]$ tem-se:

$$[OH^-] = \frac{K_w}{[H^+]} = \frac{1 \times 10^{-14}\ \text{M}^2}{0,00013\ \text{M}} = \frac{10^{-14}\ \text{M}^2}{1,3 \times 10^{-4}\ \text{M}}$$
$$= 7,7 \times 10^{-11}\ \text{M}$$

Em todos os cálculos certifique-se de arredondar a sua resposta para o número correto de algarismos significativos, como acima.

## A escala de pH indica as concentrações de $H^+$ e $OH^-$

O produto iônico da água, $K_w$, é a base para a **escala de pH** (Tabela 2-6). É um meio conveniente de designar a concentração de $H^+$ (e, portanto, de $OH^-$) em qualquer solução aquosa no intervalo de 1,0 M $H^+$ e 1,0 M $OH^-$. O termo **pH** é definido pela expressão

$$\text{pH} = \log \frac{1}{[H^+]} = -\log [H^+]$$

O símbolo p denota "logaritmo negativo de". Para uma solução neutra a 25°C, na qual a concentração de íons hidrogênio é exatamente $1,0 \times 10^{-7}$ M, o pH pode ser calculado como se segue:

$$\text{pH} = \log \frac{1}{1,0 \times 10^{-7}} = 7,0$$

Observe que a concentração de $H^+$ deve ser expressa em termos molares (M).

O valor de 7 para o pH de uma solução neutra não é um número escolhido arbitrariamente, sendo derivado do valor absoluto do produto iônico da água a 25°C, que, por uma coincidência conveniente, é um valor inteiro. Soluções com pH maior que 7 são alcalinas ou básicas; a concentração de $OH^-$ é maior que a de $H^+$. Inversamente, soluções tendo pH menor que 7 são ácidas.

Lembre-se que a escala de pH é logarítmica, e não aritmética. Se duas soluções diferem em pH por uma (1) unidade, isso significa que uma solução tem dez vezes mais a concentração de íons $H^+$ que a outra, mas isso não indica a magnitude absoluta da diferença. A **Figura 2-15** fornece os valores de pH de alguns fluidos aquosos. Um refrigerante de cola (pH 3,0) ou um vinho tinto (pH 3,7) têm uma concentração de íons $H^+$ de aproximadamente 10.000 vezes a do sangue (pH 7,4).

O pH de uma solução aquosa pode ser medido por aproximação usando vários tipos de indicadores coloridos, incluindo tornassol, fenolftaleína e vermelho de fenol. Essas substâncias passam por uma mudança de cor quando um próton se dissocia da molécula. Determinações precisas do pH em laboratórios químicos ou clínicos são feitas com um eletrodo de vidro que é seletivamente sensível à concentração dos íons $H^+$ mas insensível à concentração de $Na^+$, $K^+$ e outros cátions. Em um pH-metro, o sinal do eletrodo de vidro colocado em uma solução de teste é amplificado e comparado com o sinal gerado por uma solução de pH conhecido.

**TABELA 2-6** A escala de pH

| $[H^+]$ (M) | pH | $[OH^-]$ (M) | pOH* |
|---|---|---|---|
| $10^0$ (1) | 0 | $10^{-14}$ | 14 |
| $10^{-1}$ | 1 | $10^{-13}$ | 13 |
| $10^{-2}$ | 2 | $10^{-12}$ | 12 |
| $10^{-3}$ | 3 | $10^{-11}$ | 11 |
| $10^{-4}$ | 4 | $10^{-10}$ | 10 |
| $10^{-5}$ | 5 | $10^{-9}$ | 9 |
| $10^{-6}$ | 6 | $10^{-8}$ | 8 |
| $10^{-7}$ | 7 | $10^{-7}$ | 7 |
| $10^{-8}$ | 8 | $10^{-6}$ | 6 |
| $10^{-9}$ | 9 | $10^{-5}$ | 5 |
| $10^{-10}$ | 10 | $10^{-4}$ | 4 |
| $10^{-11}$ | 11 | $10^{-3}$ | 3 |
| $10^{-12}$ | 12 | $10^{-2}$ | 2 |
| $10^{-13}$ | 13 | $10^{-1}$ | 1 |
| $10^{-14}$ | 14 | $10^0$ (1) | 0 |

* A expressão pOH é algumas vezes usada para descrever a alcalinidade, ou concentração, de $OH^-$ de uma solução; o pOH é definido pela expressão pOH = – log $[OH^-]$, que é análoga à expressão para o pH. Observe que em todos os casos, pH + pOH = 14.

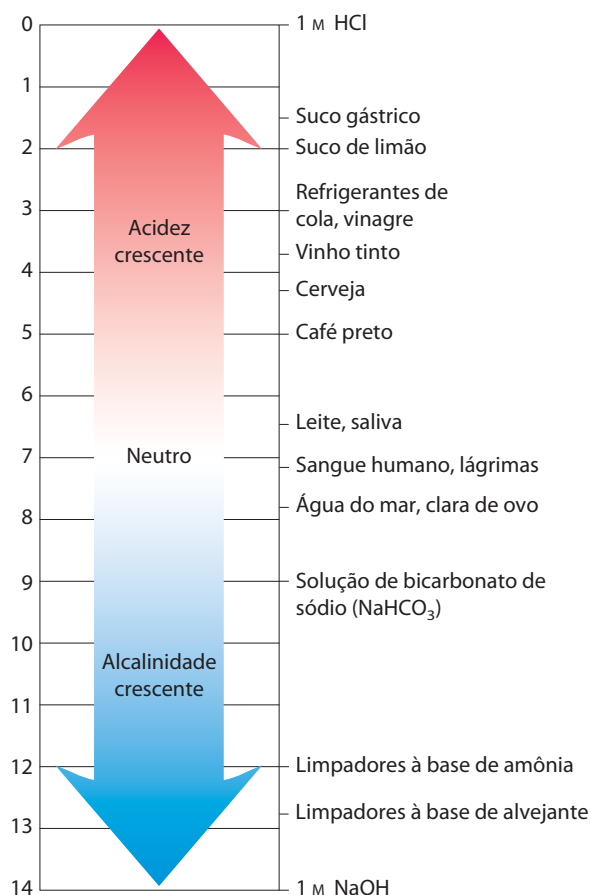



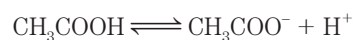
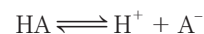
**FIGURA 2-15** **O pH de alguns fluidos aquosos.**

A medida do pH é um dos procedimentos mais importantes e usados com mais frequência na bioquímica. O pH afeta a estrutura e a atividade de macromoléculas biológicas; por exemplo, a atividade catalítica das enzimas é extremamente dependente do pH (ver Figura 2-22). As medidas do pH do sangue e da urina são comumente usadas em diagnóstico médico. O pH do plasma sanguíneo das pessoas com diabetes grave e não controlado é comumente abaixo do valor normal de 7,4; essa condição é chamada de **acidose** (descrita com maior detalhes a seguir). Em algumas outras doenças, o pH sanguíneo é mais alto que o normal, uma condição conhecida como **alcalose**. A acidose ou a alcalose extremas podem ameaçar a vida. ■

## Ácidos e bases fracas têm constantes de dissociação ácidas características

Os ácidos clorídrico, sulfúrico e nítrico, comumente chamados de ácidos fortes, são completamente ionizados em soluções aquosas diluídas; as bases fortes NaOH e KOH também são completamente ionizadas. O que mais interessa aos bioquímicos é o comportamento de ácidos e bases não completamente ionizados quando dissolvidos em água. Eles estão presentes em sistemas biológicos e desempenham papéis importantes no metabolismo e na sua regulação. O comportamento de soluções aquosas de ácidos e bases fracas será mais bem compreendido definindo primeiramente alguns termos.

Os ácidos podem ser definidos como doadores de prótons e as bases como aceptoras de prótons. Quando um doador de prótons como o ácido acético ($CH_3COOH$) perde um próton, ele se torna o correspondente aceptor de prótons, nesse caso o ânion acetato ($CH_3COO^-$). Um doador de prótons e seu correspondente aceptor de prótons constituem um **par conjugado ácido-base** (**Figura 2-16**), conforme a reação reversível:

$$CH_3COOH \rightleftharpoons CH_3COO^- + H^+$$

Cada ácido tem uma tendência característica de perder seu próton em uma solução aquosa, e quanto mais forte for o ácido, maior a tendência de perder seu próton. A tendência de qualquer ácido (HA) de perder um próton e formar sua base conjugada ($A^-$) é definida pela constante de equilíbrio ($K_{eq}$) para a reação reversível:

$$HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$$

para a qual

$$K_{eq} = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} = K_a$$

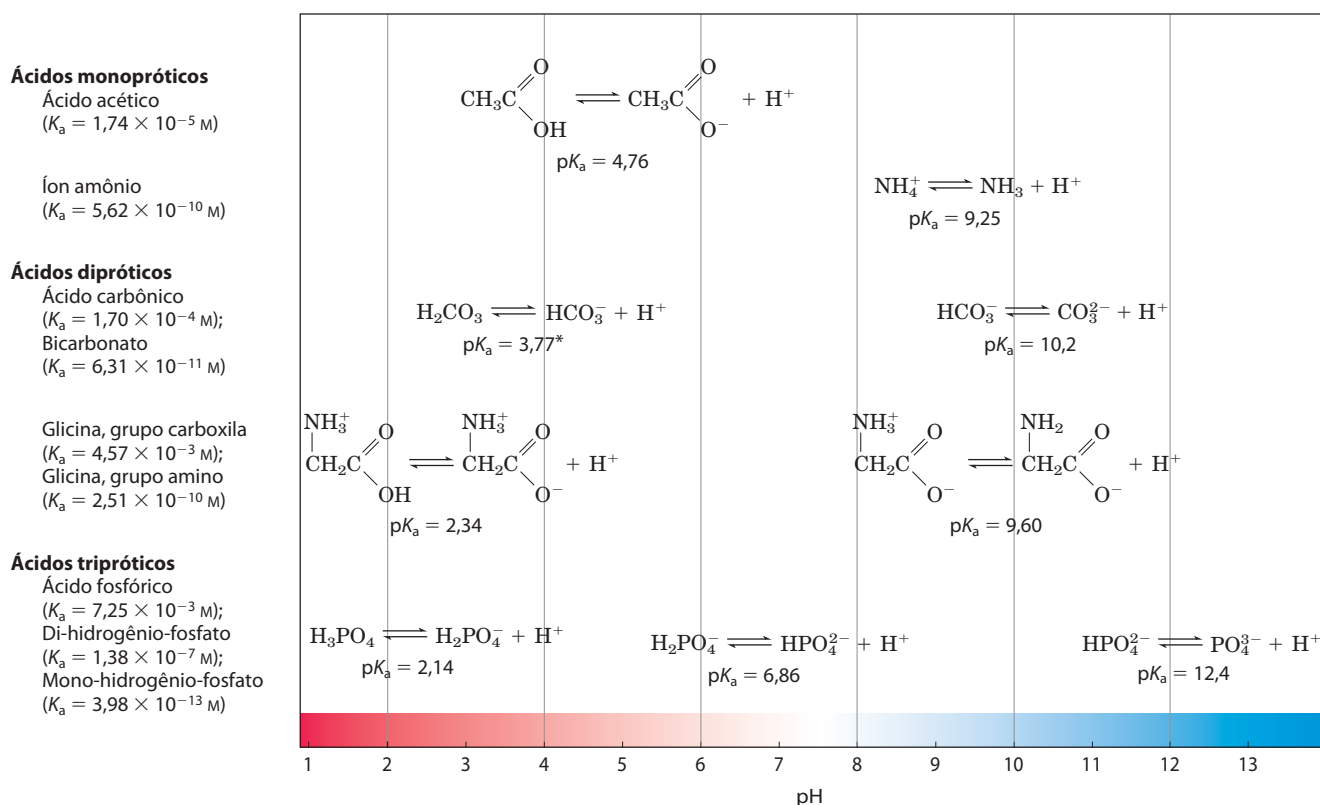



**FIGURA 2-16 Pares conjugados ácido-base consistem em um doador de prótons e um aceptor de prótons.** Alguns compostos como o ácido acético e íons amônio são monopróticos; eles só podem doar um próton. Outros são dipróticos (ácido carbônico e glicina) ou tripróticos (ácido fosfórico). As reações de dissociação de cada par são mostradas onde elas ocorrem ao longo de um gradiente de pH. A constante de equilíbrio ou dissociação ($K_a$) e seu logaritmo negativo, o p$K_a$, são mostrados para cada reação. *Consulte a p. 67 para uma explicação sobre as aparentes discrepâncias dos valores de p$K_a$ do ácido carbônico ($H_2CO_3$).

As constantes de equilíbrio para as reações de ionização são comumente chamadas de **constantes de ionização** ou **constantes de dissociação ácidas**, frequentemente designadas por $K_a$. As constantes de dissociação de alguns ácidos são fornecidas na Figura 2-16. Ácidos mais fortes, como os ácidos fosfórico e carbônico, têm constantes de ionização maiores; ácidos mais fracos, como o fosfato mono-hidrogenado ($HPO_4^{2-}$), têm constantes de ionização menores.

Também presentes na Figura 2-16 estão os valores de **p$K_a$**, que é análogo ao pH e é definido pela equação

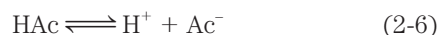
$$pK_a = \log \frac{1}{K_a} = -\log K_a$$

Quanto mais forte a tendência de dissociar um próton, mais forte será o ácido e mais baixo será o seu p$K_a$. Como será visto agora, o p$K_a$ de qualquer ácido fraco pode ser determinado facilmente.

## As curvas de titulação revelam o p$K_a$ de ácidos fracos

A titulação é usada para determinar a quantidade de um ácido em certa solução. Um dado volume do ácido é titulado com uma solução de base forte, geralmente hidróxido de sódio (NaOH), de concentração conhecida. O NaOH é adicionado em pequenos incrementos até o ácido ser consumido (neutralizado), como determinado com um indicador ou um pH-metro. A concentração do ácido na solução original pode ser calculada a partir do volume e da concentração de NaOH adicionado. A quantidade de ácido e base na titulação são comumente expressas em termo de equivalentes, onde um equivalente é a quantidade de substância que irá reagir com, ou suprir, um mol de íons de hidrogênio em uma reação ácido-base.

Uma curva de pH contra a quantidade de NaOH adicionada (uma **curva de titulação**) revela o p$K_a$ do ácido fraco. Considere a titulação de uma solução 0,1 M de ácido acético com 0,1 M de NaOH a 25ºC (**Figura 2-17**). Duas reações reversíveis de equilíbrio estão envolvidas no processo (aqui, por simplicidade, o ácido acético será designado por HAc):

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^- \quad (2\text{-}5)$$

$$HAc \rightleftharpoons H^+ + Ac^- \quad (2\text{-}6)$$

O equilíbrio deve ocorrer simultaneamente, obedecendo às características das constantes de equilíbrio, que são, respectivamente,

$$K_w = [H^+][OH^-] = 1 \times 10^{-14}\ M^2 \quad (2\text{-}7)$$

$$K_a = \frac{[H^+][Ac^-]}{[HAc]} = 1{,}74 \times 10^{-5}\ M \quad (2\text{-}8)$$

No início da titulação, antes da adição de NaOH, o ácido acético já encontra-se parcialmente ionizado, em um valor que pode ser calculado a partir de sua constante de ionização (Equação 2-8).

À medida que NaOH for sendo gradualmente introduzido, o íon $OH^-$ adicionado se combina com os íons livres $H^+$ na solução para formar $H_2O$, em uma quantidade que satisfaz a relação de equilíbrio da Equação 2-7. Como os íons $H^+$ são removidos, o HAc se dissocia um pouco mais para satisfazer sua própria constante de equilíbrio (Equação 2-8). A titulação prossegue de forma que uma maior quantidade de HAc ioniza, formando $Ac^-$, na medida em que o NaOH é adicionado. No ponto central da titulação no qual exatos 0,5 equivalentes de NaOH foram adicionados por equivalente do ácido, metade do ácido acético original se dissociou, de forma que a concentração de doadores de prótons [HAc] agora é igual à do aceptor de prótons [$Ac^-$]. Nesse ponto central, uma relação muito importante é estabelecida: o pH da solução equimolar de ácido acético e de acetato é exatamente igual ao p$K_a$ do ácido acético (p$K_a$ = 4,76; Figuras 2-16, 2-17). A base para essa relação, que é válida para todos os ácidos fracos, ficará clara em breve.

**FIGURA 2-17 A curva de titulação do ácido acético.** Depois da adição de cada incremento de NaOH à solução de ácido acético, o pH da mistura é medido. Esse valor é colocado em um gráfico em função da quantidade de NaOH adicionada, expresso como a fração da concentração total requerida para converter todo o ácido acético ($CH_3COOH$) na sua forma desprotonada, acetato ($CH_3COO^-$). Os pontos então obtidos geram a curva de titulação. Nos retângulos estão mostradas as formas iônicas predominantes nos pontos designados. No ponto central da titulação, as concentrações de doadores de prótons e aceptores de prótons são iguais, e o pH é numericamente igual ao p$K_a$. A zona sombreada é a região útil do poder tamponante, geralmente entre 10 e 90% da titulação de um ácido fraco.

À medida que a titulação continua pela adição de mais NaOH, o ácido acético não dissociado remanescente é convertido em acetato. O ponto final da titulação ocorre em pH próximo de 7,0: todo o ácido acético perdeu seus prótons para os íons $OH^-$, para formar $H_2O$ e acetato. Por meio da titulação os dois equilíbrios (Equação 2-5, 2-6) coexistem, cada um obedecendo à sua constante de equilíbrio.

A **Figura 2-18** compara as curvas de titulação de três ácidos fracos com constantes de ionização bem diferentes: ácido acético (p$K_a$= 4,76); ácido fosfórico, $H_2PO_4^-$ (p$K_a$ = 6,86); e íon amônio, $NH_4^+$ (p$K_a$ = 9,25). Embora as curvas

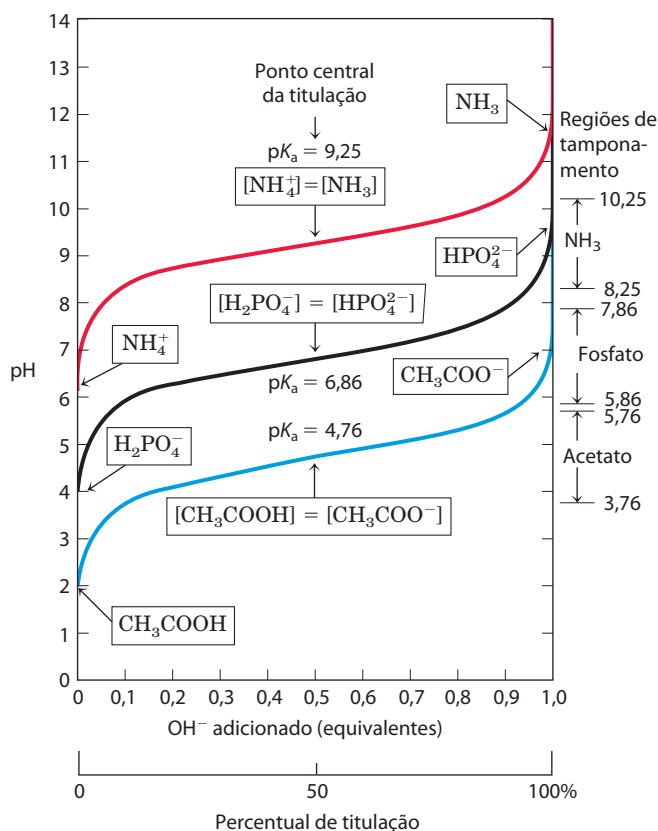



**FIGURA 2-18 Comparação das curvas de titulação de três ácidos fracos.** Aqui estão mostradas as curvas de titulação para $CH_3COOH$, $H_2PO_4^-$ e $NH_4^+$. As formas iônicas predominantes nos pontos designados da titulação estão destacadas nos retângulos. As regiões da capacidade tamponante estão indicadas à esquerda. Os pares conjugados ácido-base são tampões efetivos entre aproximadamente 10 e 90% da neutralização das espécies doadoras de prótons.

de titulação desses ácidos tenham a mesma forma, elas são deslocadas ao longo do eixo do pH devido aos três ácidos possuírem diferentes forças. O ácido acético, com o maior $K_a$ (menor p$K_a$) dos três, é o mais forte dos ácidos fracos (perde seu próton mais prontamente); ele já se encontra dissociado pela metade no pH 4,76. O di-hidrogênio-fosfato perde um próton menos prontamente, estando dissociado pela metade no pH 6,86. O íon amônio é o ácido mais fraco dos três, e só se encontra dissociado pela metade no pH 9,25.

A curva de titulação de um ácido fraco mostra graficamente que um ácido fraco e seu ânion – um par conjugado ácido-base – podem agir como um tampão, conforme será descrito na próxima seção.

## RESUMO 2.2 Ionização da água e de ácidos e bases fracas

- A água pura se ioniza levemente, formando número igual de íons hidrogênio (íons hidrônio, $H_3O^+$) e íons hidróxido. A extensão da ionização é descrita pela constante de equilíbrio, $K_{eq} = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}$, da qual o produto iônico da água, $K_w$, é obtido. A 25°C, $K_w = [H^+]\,OH^-] = (55{,}5\ \text{M})\,(K_{eq}) = 10^{-14}\ \text{M}^2$.
- O pH de uma solução aquosa reflete, em escala logarítmica, a concentração de íons hidrogênio:

$$\text{pH} = \log\frac{1}{[H^+]} = -\log\,[H^+].$$

- Quanto maior a acidez de uma solução, mais baixo é o pH. Ácidos fracos se ionizam parcialmente para liberar um íon hidrogênio, baixando, portanto, o pH de uma solução aquosa. Bases fracas aceitam um íon hidrogênio, aumentando o pH. A extensão desses processos é característica de cada ácido ou base fraca e é expressa como uma constante de dissociação ácida:

$$K_{eq} = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} = K_a.$$

- O p$K_a$ expressa, em uma escala logarítmica, a força relativa de um ácido ou base fraca:

$$\text{p}K_a = \log\frac{1}{K_a} = -\log K_a.$$

- Quanto mais forte o ácido, menor é o seu valor de p$K_a$; quanto maior a base, maior é o valor do p$K_a$. O p$K_a$ pode ser determinado experimentalmente; é o pH no ponto central da curva de titulação para o ácido ou a base.

## 2.3 Tamponamento contra mudanças no pH em sistemas biológicos

Quase todos os processos biológicos são dependentes do pH; uma pequena mudança no pH produz uma grande mudança na velocidade do processo. Isso é válido não somente para as muitas reações nas quais os íons $H^+$ são participantes diretos, mas também para aquelas reações nas quais não existe aparentemente não há participação de íons $H^+$. As enzimas que catalisam reações celulares, e muitas das moléculas nas quais elas agem, contêm grupos ionizáveis com valores de p$K_a$ característicos. Os grupos amino e carboxila protonados de aminoácidos e os grupos fosfato de nucleotídeos, por exemplo, agem como ácidos fracos; o seu estado iônico é determinado pelo pH do meio circundante. (Quando um grupo ionizável é capturado no meio de uma proteína, longe do solvente aquoso, seu p$K_a$, ou o p$K_a$ aparente, pode ser significativamente diferente do seu pH na água.) Como observado anteriormente, as interações iônicas estão entre as forças que estabilizam a molécula da proteína e permitem que uma enzima reconheça e se ligue ao seu substrato.

Células e organismos mantêm um pH citosólico específico e constante, em geral perto de pH 7, mantendo biomoléculas em seu estado iônico otimizado. Em organismos multicelulares, o pH dos fluidos extracelulares também é rigorosamente regulado. A constância do pH é atingida principalmente por tampões biológicos: misturas de ácidos fracos e suas bases conjugadas.

## Tampões são misturas de ácidos fracos e suas bases conjugadas

**Tampões** são sistemas aquosos que tendem a resistir a mudanças de pH quando pequenas quantidades de ácido ($H^+$) ou base ($OH^-$) são adicionadas. Um sistema tampão consiste em um ácido fraco (o doador de prótons) e sua base conjugada (o aceptor de prótons). Como um exemplo, uma mistura de concentrações iguais de ácido acético e íons acetato, encontradas no ponto central da titulação na Figura 2-17, é um sistema tampão. Observe que a curva de titulação do ácido acético tem uma zona relativamente plana que se estende por cerca de uma unidade de pH em ambos os lados do seu pH do ponto central de 4,76. Nessa zona, uma dada quantidade de $H^+$ ou $OH^-$ adicionada ao sistema tem muito menos efeito no pH que a mesma quantidade adicionada fora da zona. Essa zona relativamente plana é a **região de tamponamento** do par tampão ácido acético/acetato. No ponto central da região de tamponamento, no qual a concentração do doador de prótons (ácido acético) é exatamente igual à do aceptor de prótons (acetato), a força de tamponamento do sistema é máxima; isto é, seu pH muda menos pela adição de $H^+$ ou $OH^-$. O pH nesse ponto na curva de titulação do ácido acético é igual ao seu p$K_a$. O pH do sistema tampão acetato muda levemente quando uma pequena quantidade de $H^+$ ou $OH^-$ é adicionada, mas essa mudança é muito pequena comparada com a mudança de pH que resultaria se a mesma quantidade de $H^+$ ou $OH^-$ fosse adicionado à água pura ou a uma solução salina de um ácido forte e de uma base forte, como NaCl, que não tem poder tamponante.

O tamponamento resulta do equilíbrio entre duas reações reversíveis ocorrendo em uma solução de concentrações quase iguais de doador de prótons e de seu aceptor de prótons conjugado. A **Figura 2-19** explica como um sistema tampão funciona. Sempre que $H^+$ ou $OH^-$ é adicionado em um tampão, o resultado é uma pequena mudança na razão das concentrações relativas dos ácidos fracos e seus ânions e, portanto, uma pequena mudança no pH. O decréscimo na concentração de um componente do sistema é equilibrado exatamente pelo aumento do outro. A soma dos componentes do tampão não muda, somente a sua razão.

Cada par conjugado ácido-base tem uma zona de pH característica na qual é um tampão efetivo (Figura 2-18). O par $H_2PO_4^-$/ $HPO_4^{2-}$ tem um p$K_a$ de 6,86 e, portanto, pode servir como um sistema tampão efetivo entre os pHs 5,9 e 7,9; o par $NH_4^+$/$NH_3$, com um p$K_a$ de 9,25, pode agir como um tampão em um intervalo de pH aproximado entre 8,3 e 10,3.

## A equação de Henderson-Hasselbalch relaciona o pH, o p$K_a$ e a concentração do tampão

As curvas de titulação do ácido acético, $H_2PO_4^-$ e $NH_4^+$ (Figura 2-18) têm formas quase idênticas, sugerindo que essas curvas refletem uma lei ou relação fundamental. De fato esse é o caso. A forma da curva de titulação de qualquer ácido fraco é descrita pela equação de Henderson-Hasselbalch, que é importante para o entendimento das ações do tampão e do equilíbrio acidobásico no sangue e nos tecidos dos vertebrados. Essa equação é simplesmente uma forma útil de reescrever a expressão para a constante de ionização de um ácido. Para a ionização de um ácido fraco HA, a equação de Henderson-Hasselbalch pode ser deduzida como se segue:

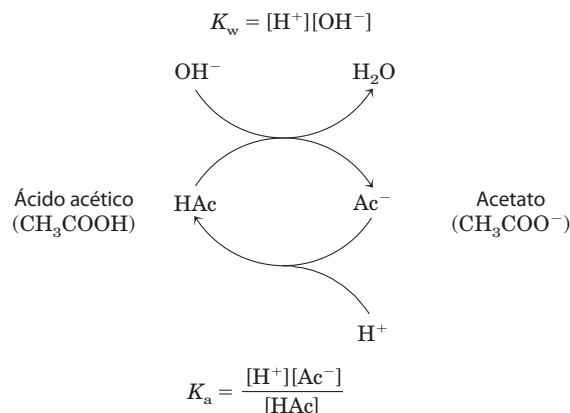



**FIGURA 2-19 O par ácido acético/acetato como sistema tampão.** O sistema é capaz de absorver tanto $H^+$ quanto $OH^-$ por meio da reversibilidade da reação de dissociação do ácido acético. O doador de prótons, ácido acético (HAc), contém uma reserva de $H^+$, que podem ser liberados para neutralizar uma adição de $OH^-$ ao sistema, formando $H_2O$. Isso acontece devido ao produto $[H^+]$ $[OH^-]$ exceder temporariamente o $K_w$ ($1 \times 10^{-14}$ M$^2$). O equilíbrio rapidamente se ajusta para restaurar o produto a $1 \times 10^{-14}$ M$^2$ (a 25ºC), reduzindo temporariamente a concentração de $H^+$. Agora o quociente $[H^+][Ac^-]/[HAc]$ é menor que $K_a$, então HAc se dissocia ainda mais para restaurar o equilíbrio. Similarmente, a base conjugada $Ac^-$ pode reagir com íons $H^+$ adicionados ao sistema; novamente, as duas reações de ionização simultaneamente chegam ao equilíbrio. Portanto, o par conjugado ácido-base, como o ácido acético e o íon acetato, tende a resistir a mudanças no pH quando pequenas quantidades de ácido ou base são adicionadas. A ação tamponante é simplesmente a consequência de duas reações reversíveis acontecendo simultaneamente e atingindo os seus pontos de equilíbrio como determinado pelas suas constantes de equilíbrio, $K_w$ e $K_a$.

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

Primeiramente resolver para $[H^+]$:

$$[H^+] = K_a \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Usar o logaritmo negativo em ambos os lados da equação:

$$-\log[H^+] = -\log K_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Substituir o pH por $-\log [H^+]$ e o p$K_a$ por $-\log K_a$:

$$\text{pH} = \text{p}K_a - \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Agora inverter $-\log [HA]/[A^-]$, o que envolve a mudança do sinal, para obter a **equação de Henderson-Hasselbalch**:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (2\text{-}9)$$

Essa equação é válida para as curvas de titulação de todos os ácidos fracos e permite deduzir algumas relações quantitativas importantes. Por exemplo, mostra por que o p$K_a$ de um ácido fraco é igual ao pH de uma solução no ponto central da titulação. Nesse ponto, $[HA] = [A^-]$, e

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log 1 = \text{p}K_a + 0 = \text{p}K_a$$

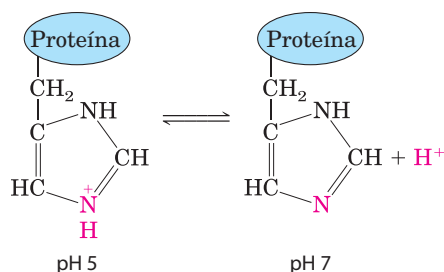



**FIGURA 2-20 Ionização da histidina.** O aminoácido histidina, um componente das proteínas, é um ácido fraco. O p$K_a$ do nitrogênio protonado da cadeia lateral é 6,0.

A equação de Henderson-Hasselbalch também permite (1) calcular o p$K_a$, dado o pH e a razão molar do doador e do aceptor de prótons; (2) calcular o pH, dado o p$K_a$ e a razão molar do doador e do aceptor de prótons; e (3) calcular a razão molar entre doador e aceptor de prótons, dados o pH e o p$K_a$.

## Ácidos ou bases fracas tamponam células e tecidos contra as mudanças de pH

Os fluidos intracelulares ou extracelulares de organismos multicelulares têm como característica um pH quase constante. A primeira linha de defesa dos organismos contra mudanças internas de pH é proporcionada por sistemas tampão. O citoplasma da grande maioria das células contém altas concentrações de proteínas e essas proteínas contêm muitos aminoácidos com grupos funcionais que são ácidos fracos ou bases fracas. Por exemplo, a cadeia lateral da histidina (**Figura 2-20**) tem um p$K_a$ de 6,0 e, por isso, pode existir tanto nas formas protonadas quanto nas desprotonadas próximo ao pH neutro. Proteínas contendo resíduos de histidina, portanto, são tampões efetivos próximo ao pH neutro.

**PROBLEMA RESOLVIDO 2-5 Ionização da histidina**

Calcule a fração de histidina que tem a cadeia lateral imidazólica protonada em pH de 7,3. Os valores de p$K_a$ para a histidina são p$K_1$ = 1,8, p$K_2$ (imidazol) = 6,0 e p$K_3$= 9,2 (ver Figura 3-12b).

**Solução:** Os três grupos ionizáveis na histidina tem valores de p$K_a$ suficientemente diferentes, de forma que o primeiro (—COOH) é completamente ionizado antes do segundo (imidazol protonado) começar a dissociar um próton, e o segundo ioniza completamente antes do terceiro ($—NH_3^+$) começar a dissociar seu próton. (Com a equação de Henderson-Hasselbalch, é possível facilmente mostrar que um ácido fraco passa de 1% ionizado em 2 unidades de pH abaixo de seu p$K_a$ para 99% ionizado em 2 unidades de pH acima de seu p$K_a$; ver também Figura 3-12b.) No pH 7,3, o grupo carboxila da histidina está inteiramente desprotonado ($—COO^-$) e o grupo $\alpha$-amino está completamente protonado. Supõe-se que, no pH 7,3, o único grupo que está parcialmente dissociado é o grupo imidazólico que pode estar protonado (abreviado como $HisH^+$) ou não protonado (His).

Aplicando a equação de Henderson-Hasselbalch:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Substituindo p$K_2$ = 6,0 e pH = 7,3:

$$7{,}3 = 6{,}0 + \log \frac{[\text{His}]}{[\text{HisH}^+]}$$

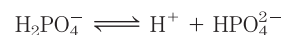
$$1{,}3 = \log \frac{[\text{His}]}{[\text{HisH}^+]}$$

$$\text{antilog } 1{,}3 = \frac{[\text{His}]}{[\text{HisH}^+]} = 2{,}0 \times 10^1$$

Isso dá a *razão* do [His] para [$HisH^+$] (20 para 1 nesse caso). É necessário converter a *fração* da histidina que está na forma desprotonada His no pH 7,3. Essa *fração* é 20/21 (20 partes de His para cada 1 parte de $HisH^+$, *em um total de 21 partes de histidina* em qualquer forma), ou cerca de 95,2%; o resto (100% menos 95,2%) é protonado – aproximadamente 5%.

Nucleotídeos como ATP, assim como muitos metabólitos de baixa massa molecular, contêm grupos ionizáveis que podem contribuir para o poder tamponante do citoplasma. Algumas organelas altamente especializadas e compartimentos extracelulares apresentam altas concentrações de compostos que contribuem para a capacidade de tamponamento: ácidos orgânicos tamponam os vacúolos das células das plantas; amônia tampona a urina.

Dois tampões biológicos especialmente importantes são o sistema fosfato e o bicarbonato. O tampão fosfato, que age no citoplasma de todas as células, consiste em $H_2PO_4^-$ como doador de prótons e $HPO_4^{2-}$ como aceptor de prótons:

$$H_2PO_4^- \rightleftharpoons H^+ + HPO_4^{2-}$$

O sistema tampão fosfato é mais efetivo em um pH perto de seu p$K_a$ de 6,86 (Figuras 2-16, 2-18) e, portanto, tende a resistir a mudanças de pH em um intervalo de 5,9 e 7,9. Esse é, então, um tampão efetivo em fluidos biológicos; em mamíferos, por exemplo, fluidos extracelulares e a maioria dos compartimentos citoplasmáticos têm pH no intervalo de 6,9 a 7,4.

**PROBLEMA RESOLVIDO 2-6 Tampões fosfato**

**(a)** Qual é o pH de uma mistura de 0,042 M de $NaH_2PO_4$ e 0,058 M de $Na_2HPO_4$?

**Solução:** utiliza-se a equação de Henderson-Hasselbalch, expressa aqui como:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{base conjugada}]}{[\text{ácido}]}$$

Nesse caso, o ácido (a espécie que doa prótons) é $H_2PO_4^-$, e a base conjugada (a espécie que ganha um próton) é $HPO_4^{2-}$. Substituindo as concentrações dadas de ácido e base conjugada e o p$K_a$ (6,86):

$$\text{pH} = 6{,}86 + \log \frac{0{,}058}{0{,}042} = 6{,}86 + 0{,}14 = 7{,}0$$

É possível verificar aproximadamente esse resultado. Quando está presente mais base conjugada que ácido, o ácido está mais que 50% titulado e, portanto, o pH está acima do p$K_a$ (6,86), onde o ácido está exatamente 50% titulado.

**(b)** Se 1,0 mL de solução NaOH 10 M é adicionado em um litro de tampão preparado como em (a), de quanto será a alteração do pH?

**Solução:** Um litro do tampão contém 0,042 mols de $NaH_2PO_4$. A adição de 1,0 mL de solução NaOH 10 M (0,010 mol) poderia titular uma quantidade equivalente (0,010 mol) de $NaH_2PO_4$ para $Na_2HPO_4$, resultando em 0,032 mol de $NaH_2PO_4$ e 0,068 mol de $Na_2HPO_4$. O novo pH é:

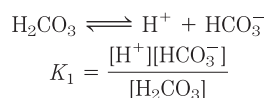
$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]}$$
$$= 6{,}86 + \log \frac{0{,}068}{0{,}032} = 6{,}86 + 0{,}33 = 7{,}2$$

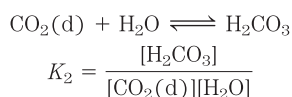
**(c)** Se 1,0 mL de solução NaOH 10 M é adicionado em um litro de água pura em pH 7,0, qual será o pH final? Compare esse resultado com a resposta encontrada em (b).

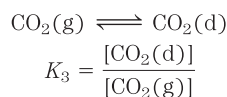
**Solução:** O NaOH se dissocia completamente em $Na^+$ e $OH^-$, gerando uma concentração de $[OH^-]$ de 0,010 mol/L = $1 \times 10^{-2}$ M. O pOH é o logaritmo negativo de $[OH^-]$, logo, pOH = 2,0. Dado que em todas as soluções pH + pOH = 14, o pH da solução é 12.

Assim, uma quantidade de NaOH que aumenta o pH da água de 7 para 12 aumenta o pH de solução tamponada, como em (b), de 7,0 para 7,2. Tal é o poder do tamponamento!

O plasma sanguíneo é tamponado em parte pelo sistema tampão do bicarbonato, consistindo em ácido carbônico ($H_2CO_3$) como doador de prótons e bicarbonato ($HCO_3^-$) como aceptor de prótons ($K_1$ é a primeira de várias constantes de equilíbrio no sistema de tamponamento do bicarbonato):

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$
$$K_1 = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$$

Esse sistema tampão é mais complexo que outros pares ácido-base conjugados porque um de seus componentes, ácido carbônico ($H_2CO_3$), é formado a partir de dióxido de carbono dissolvido (d) e água, em uma reação reversível:

$$CO_2(d) + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$$
$$K_2 = \frac{[H_2CO_3]}{[CO_2(d)][H_2O]}$$

O dióxido de carbono é um gás sob condições normais, e $CO_2$ dissolvido em uma solução aquosa está em equilíbrio com o $CO_2$ em fase gasosa (g):

$$CO_2(g) \rightleftharpoons CO_2(d)$$
$$K_3 = \frac{[CO_2(d)]}{[CO_2(g)]}$$

O pH de uma solução tampão de bicarbonato depende da concentração de $H_2CO_3$ e $HCO_3^-$, os componentes doador e receptor de prótons. A concentração de $H_2CO_3$ por sua vez depende da concentração de $CO_2$ na fase gasosa, ou da **pressão parcial** de $CO_2$, designada por p$CO_2$. Portanto, o pH de um tampão de bicarbonato exposto a uma fase gasosa é determinado pela concentração de $HCO_3^-$ na fase aquosa e pela p$CO_2$ na fase gasosa.

A solução tampão de bicarbonato é um tampão fisiológico efetivo em pH próximo de 7,4, porque o $H_2CO_3$ do plasma sanguíneo está em equilíbrio com uma grande capacidade de reserva de $CO_2$ (g) no ar contido nos pulmões. Como observado anteriormente, esse sistema de tamponamento envolve três equilíbrios reversíveis, nesse caso entre o $CO_2$ gasoso nos pulmões e o bicarbonato ($HCO_3^-$) no plasma sanguíneo (**Figura 2-21**).

O sangue pode recolher $H^+$ do ácido láctico produzido no tecido muscular durante um exercício vigoroso. Alternativamente, ele pode perder $H^+$, na protonação do $NH_3$ produzido durante o catabolismo das proteínas. Quando $H^+$ é adicionado ao sangue à medida que passa pelos tecidos, a reação 1 da Figura 2-21 caminha para um novo equilíbrio, no qual a $[H_2CO_3]$ aumenta. Isso, por sua vez, aumenta a $[CO_2(d)]$ no sangue (reação 2), aumentando assim a pressão parcial de $CO_2(g)$ no ar dos pulmões (reação 3); o $CO_2$ excedente é exalado. Inversamente, quando $H^+$ é perdido do sangue, a situação oposta ocorre: mais $H_2CO_3$ é dissociado em $H^+$ e $HCO_3^-$ e, portanto, mais $CO_2$ dos pulmões se dissolve dentro do plasma. A taxa de respiração – que é a taxa de inalação ou exalação – pode ajustar rapidamente esses equilíbrios para manter o pH sanguíneo relativamente constante. A taxa de respiração é controlada pelo tronco encefálico, no qual a detecção de aumento de p$CO_2$ sanguíneo ou de diminuição do pH sanguíneo aciona uma respiração mais profunda e mais frequente.

No pH do plasma sanguíneo (7,4) muito pouco de $H_2CO_3$ está presente em comparação com $HCO_3^-$, e a adição de uma pequena quantidade de base ($NH_3$ ou $OH^-$) poderia titular esse $H_2CO_3$, exaurindo a capacidade tamponante. O papel importante do $H_2CO_3$ (p$K_a$ = 3,57 a 37ºC) no tamponamento

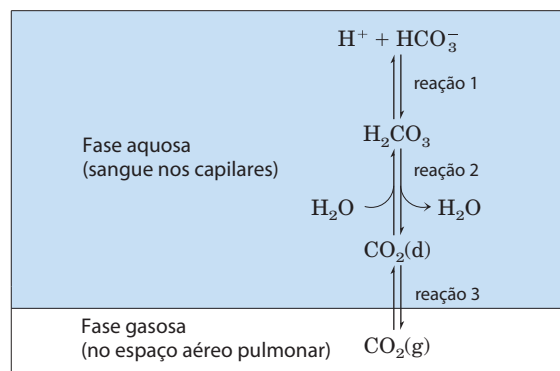
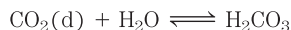



**FIGURA 2-21** **O sistema tampão do bicarbonato.** O $CO_2$ no espaço aéreo pulmonar está em equilíbrio com o tampão bicarbonato do plasma sanguíneo que circula pelos capilares pulmonares. Como a concentração de $CO_2$ dissolvido pode ser ajustada rapidamente por mudanças na taxa de respiração, o sistema tampão bicarbonato do sangue está em estreito equilíbrio com um grande reservatório potencial de $CO_2$.

do plasma sanguíneo (pH ~7,4) parece inconsistente com a afirmação anterior de que um tampão é mais efetivo na escala de uma unidade de pH acima e abaixo do valor de p$K_a$. A explicação para esse paradoxo é o grande estoque de $CO_2$(d) no sangue. Seu rápido equilíbrio com $H_2CO_3$ resulta na formação adicional de $H_2CO_3$:

$$CO_2(d) + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$$

É útil para medicina ter uma expressão simples do pH do sangue para $CO_2$ dissolvido, a qual é comumente monitorada ao longo do tempo junto de outros gases sanguíneos. Pode-se definir uma constante, $K_h$, que é a constante de equilíbrio para a hidratação de $CO_2$ para formar $H_2CO_3$:

$$K_h = \frac{[H_2CO_3]}{[CO_2(d)]}$$

Então, considerando o estoque de $CO_2$(d), é possível expressar $[H_2CO_3]$ como $K_h[CO_2(d)]$, e substituir $[H_2CO_3]$ na equação da dissociação ácida do $H_2CO_3$:

$$K_a = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[H_2CO_3]} = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{K_h[CO_2(d)]}$$

Agora, o equilíbrio total para a dissociação do $H_2CO_3$ pode ser expresso nesses termos:

$$K_hK_a = K_{combinado} = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[CO_2(d)]}$$

É possível calcular o valor da nova constante, $K_{combinada}$, e o correspondente p$K$ aparente, ou p$K_{combinado}$ a partir dos valores determinados experimentalmente de $K_h$ ($3,0 \times 10^{-3}$ M) e $K_a$ ($2,7 \times 10^{-4}$ M) a 37°C:

$$\begin{aligned} K_{combinado} &= (3,0 \times 10^{-3}\ \text{M})(2,7 \times 10^{-4}\ \text{M}) \\ &= 8,1 \times 10^{-7}\ \text{M}^2 \\ pK_{combinado} &= 6,1 \end{aligned}$$

Em análises clínicas, é comum se referir ao $CO_2$(d) como o ácido conjugado e usar o valor de 6,1 do p$K_a$ aparente, ou combinado, para simplificar os cálculos de pH a partir da $[CO_2(d)]$. Nessa convenção,

$$pH = 6,1 + \log \frac{[HCO_3^-]}{(0,23 \times pCO_2)}$$

onde $pCO_2$ é expressa em quilopascais (kPa; $pCO_2$ tem valores de 4,6 a 6,7 kPa) e 0,23 é o coeficiente de solubilidade correspondente para o $CO_2$ na água; portanto, o termo $0,23 \times pCO_2 \approx 1,2$ kPa. A $[HCO_3^-]$ plasmática normalmente é de cerca de 24 mM. ■

## Diabetes não tratado produz acidose que ameaça a vida

O plasma sanguíneo humano normalmente tem um pH de 7,35 a 7,45, e muitas das enzimas que funcionam no sangue evoluíram para ter máxima atividade nesse intervalo de pH. Enzimas mostram máxima atividade catalítica em um pH característico, chamado de **pH ótimo** (**Figura 2-22**). Para ambos os lados desse pH ótimo, a atividade catalítica com frequência declina rapidamente. Portanto, uma pequena mudança no pH pode fazer uma grande diferença na taxa de algumas reações cruciais catalisadas por enzimas. O controle biológico do pH das células e dos fluidos corpóreos é de importância central em todos os aspectos do metabolismo e atividades celulares, e mudanças no pH sanguíneo têm consequências fisiológicas marcantes (descritas com entusiasmo no Quadro 2-1!).

Em indivíduos com diabetes melito não tratado, a falta de insulina, ou a insensibilidade à insulina (dependendo do tipo de diabetes), interrompe a captação de glicose do sangue para dentro dos tecidos e força os tecidos a armazenar ácidos graxos como combustível principal. Devido a razões que serão descritas em detalhes posteriormente (ver Figura 24-30), a dependência dos ácidos graxos resulta no acúmulo de altas concentrações de dois ácidos carboxílicos, o ácido $\beta$-hidroxibutírico e o ácido acetoacético (nível de 90 mg/100 mL no plasma sanguíneo, comparada com $<$ 3 mg/100 mL nos indivíduos saudáveis; excreção urinária de 5 g/24 h, comparada com $<$ 125 mg/24 h nos controles saudáveis). A dissociação desses ácidos diminui o pH do plasma sanguíneo para valores de menos de 7,35, causando acidose. Acidose grave leva a sintomas como dor de cabeça, vômitos e diarreia, seguido de estupor, convulsões e coma, provavelmente porque, no valor de pH mais baixo, algumas enzimas não funcionam da melhor forma. Quando um paciente apresenta alta glicose no sangue, baixo pH plasmático e altos níveis de ácido $\beta$-hidroxibutírico e ácido acetoacético na urina e no sangue, o diabetes melito é o diagnóstico provável.

Outras condições também podem produzir acidose. Jejum e inanição forçam o uso dos estoques de ácidos graxos para produção de energia, com as mesmas consequências geradas pelo diabetes. Esforço físico exagerado,

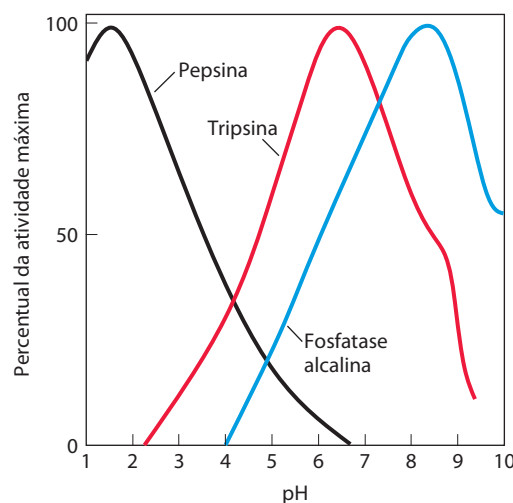



**FIGURA 2-22 O pH ótimo de algumas enzimas.** A pepsina é uma enzima digestiva secretada no suco gástrico, que tem pH ~1,5, o que permite à enzima funcionar de forma ótima. A tripsina, uma enzima digestiva que age no intestino delgado, tem um pH ótimo que se assemelha ao pH neutro do lúmen do intestino delgado. A fosfatase alcalina do tecido ósseo é uma enzima hidrolítica que presumivelmente auxilia na mineralização dos ossos.

**QUADRO 2-1**  **MEDICINA** **Sendo sua própria cobaia (não tente isso em casa!)**

Este é um relato de J. B. S. Haldane dos experimentos fisiológicos sobre o controle do pH sanguíneo, do livro *Mundos Possíveis* (Harper and Brothers, 1928).

"Eu queria descobrir o que aconteceria com um homem se ele fosse mais ácido ou mais alcalino... Poder-se-ia, claro, fazer experimentos em um coelho primeiro, e alguns trabalhos haviam sido feitos nesse sentido; mas é difícil, de qualquer forma, ter certeza como um coelho se sente. Na verdade, alguns coelhos não levavam a sério a possibilidade de cooperar comigo.

"(...) Um colega e eu então começamos a fazer experimentos em nós mesmos (...) Meu colega Dr. H. W. Davies e eu nos tornamos alcalinos pela respiração e pela ingestão de tudo que contivesse mais de 85,05 g de bicarbonato de sódio. Tornamo-nos ácidos ficando sentados em uma sala apertada contendo entre 6 e 7% de dióxido de carbono no ar. Isso faz a respiração ficar como se recém tivéssemos terminado uma regata de remo, e também dá uma tremenda dor de cabeça... Duas horas foi o máximo de tempo que alguém conseguiu permanecer sob dióxido de carbono, mesmo se a câmara de gás à nossa disposição não tivesse retido um odor irremovível de gás mostarda de alguns experimentos de guerra, o qual faz lacrimejar quem quiser que entre nela. A coisa mais óbvia a fazer foi tentar beber ácido clorídrico. Se tomássemos concentrado, isso dissolveria os dentes e queimaria a garganta, razão pela qual eu quis deixá-lo difundir-se suavemente em meu corpo. A concentração maior que tive a coragem de ingerir foi aproximadamente uma parte do ácido comercial em cem partes de água, mas meio litro foi o suficiente para mim, pois irritou minha garganta e estômago, enquanto meus cálculos mostravam que eu precisaria de um galão e meio para obter o efeito que eu desejava... Argumentei que se cloreto de amônio fosse ingerido, ele poderia se dissociar parcialmente no corpo, liberando ácido clorídrico. Isso provaria estar correto... o fígado transforma amônia em uma substância inofensiva chamada ureia antes que alcance o coração e o cérebro depois de absorvida pelo intestino. O ácido clorídrico que foi deixado para trás combina-se com o bicarbonato de sódio, que existe em todos os tecidos, produzindo cloreto de sódio e dióxido de carbono. Esse gás foi produzido em mim dessa forma na taxa de 6,6 L por hora (embora não por uma hora inteira nessa taxa)...

"Eu estava bem satisfeito de reproduzir em mim o tipo de respiração curta que ocorre nos estágios terminais de doenças dos rins e diabetes. Sabe-se, há muito tempo, que isso é devido ao envenenamento por ácido, mas em cada caso o envenenamento é complicado por outras anormalidades químicas, e não se tem certeza quais os sintomas são decorrentes do ácido em si.

"A cena agora muda para Heidelberg, onde Freudenberg e György estavam estudando o tétano em bebês... ocorreu a eles que poderia ser bastante válido tentar o efeito de aumentar de forma incomum a acidez do corpo. Visto que o tétano havia sido ocasionalmente observado em pacientes que foram tratados, por outras queixas, pela administração de doses muito altas de bicarbonato de sódio, ou perderam grande quantidade de ácido clorídrico por constantes vômitos; e se alcalinidade dos tecidos produzisse tétano, a acidez poderia ser uma expectativa de cura. Infelizmente, dificilmente se curaria um bebê moribundo colocando-o em uma sala cheia de ácido carbônico, e ainda menos com a indicação de ingestão de ácido clorídrico; então, nada poderia resultar dessa ideia, e eles estavam usando sais de lima, não facilmente absorvidos no organismo, os quais perturbam a digestão, mas certamente foram benéficos em muitos casos de tétano.

Entretanto, no momento em que leram o meu artigo sobre os efeitos do cloreto de amônio, eles começaram a administrá-lo aos bebês, e ficaram encantados ao descobrir que o tétano era eliminado em poucas horas. Desde então, tem sido usado com sucesso na Inglaterra e na América, tanto em crianças como em adultos. Ele não remove a causa, mas coloca o paciente em melhores condições de recuperação."

como corrida para atletas ou ciclistas, leva a um acúmulo temporário de ácido láctico no sangue. A deficiência renal resulta na diminuição da capacidade de regular os níveis de bicarbonato. Doenças do pulmão (como enfisema, pneumonia e asma) reduzem a capacidade de disponibilidade do $CO_2$ produzido por oxidação dos combustíveis nos tecidos, com o resultante acúmulo de $H_2CO_3$. A acidose é tratada de acordo com a condição apresentada – insulina para pessoas com diabetes; esteroides ou antibióticos para pessoas com doenças pulmonares. Acidose grave pode ser revertida pela administração intravenosa de solução de bicarbonato. ■

**PROBLEMA RESOLVIDO 2-7** **Tratamento de acidose com bicarbonato**

Por que a administração intravenosa de uma solução de bicarbonato aumenta o pH do plasma sanguíneo?

**Solução:** A razão entre $[HCO_3^-]$ e $[CO_2(d)]$ determina o pH do tampão de bicarbonato, de acordo com a equação

$$pH = 6{,}1 + \log \frac{[HCO_3^-]}{(0{,}23 \times pCO_2)}$$

Se $[HCO_3^-]$ aumenta sem mudança no $pCO_2$, o pH irá aumentar.

### RESUMO 2.3 Tamponamento contra mudanças no pH em sistemas biológicos

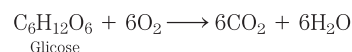
- Uma mistura de um ácido fraco (ou base) e seus sais resiste a mudanças de pH causadas pela adição de $H^+$ ou $OH^-$. A mistura, portanto, funciona como tampão.
- O pH de uma solução de um ácido ou base fraca e seus sais é dado pela equação de Henderson-Hasselbalch:

  equação: $pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$.
- Em células e tecidos, tampões de fosfatos e bicarbonatos mantêm os fluidos intracelulares e extracelulares em seu pH ótimo (fisiológico), que em geral é próximo de 7. As enzimas costumam ter atividade ótima nesse pH.
- Condições de saúde que diminuem o pH sanguíneo, causando acidose, ou aumentam, causando alcalose, podem ameaçar a vida.

## 2.4 A água como reagente

A água não é apenas o solvente no qual as reações químicas das células vivas ocorrem; é muitas vezes um participante direto nessas reações. A formação de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico é um exemplo de uma **reação de condensação** na qual os elementos da água são eliminados (**Figura 2-23**). O reverso dessa reação – clivagem acompanhada pela adição de elementos da água – é **uma reação de hidrólise**. As reações de hidrólise são também responsáveis pela despolimerização enzimática de proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. As reações de hidrólise, catalisadas por enzimas chamadas de **hidrolases**, são quase sempre exergônicas; pela produção de duas moléculas a partir de uma, elas levam a um aumento do grau de desordem do sistema. A formação de polímeros celulares a partir de suas subunidades por simples reversão da hidrólise (isto é, por reações de condensação) seria endergônica e, portanto, não ocorre. Como será visto, as células evitam esse obstáculo termodinâmico pelo acoplamento das reações de condensação endergônicas a processos exergônicos, como a quebra da ligação de anidrido no ATP.

Você está consumindo oxigênio à medida que está lendo. A água e o dióxido de carbono são os produtos finais de uma oxidação de combustível como a glicose. A reação global pode ser descrita como:

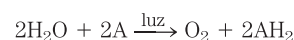
$$\underset{\text{Glicose}}{C_6H_{12}O_6} + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

A "água metabólica" formada pela oxidação de alimentos e gorduras armazenadas é na verdade suficiente para permitir que alguns animais (gerbilos, ratos-canguru, camelos) sobrevivam por longos períodos de tempo em ambientes muito secos sem beber água.

O $CO_2$ produzido por oxidação da glicose é convertido nos eritrócitos ao produto mais solúvel $HCO_3^-$, em uma reação catalisada pela enzima anidrase carbônica:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

Nessa reação, a água não somente é um substrato, mas também age na transferência de prótons pela formação de uma rede de moléculas de água unidas por ligações de hidrogênio onde ocorrem os saltos de prótons (Figura 2-14).

Plantas verdes e algas usam a energia da luz solar para quebrar a molécula de água no processo de fotossíntese:

$$2H_2O + 2A \xrightarrow{\text{luz}} O_2 + 2AH_2$$

Nessa reação, A é uma espécie aceptora de elétrons, que varia com o tipo de organismo fotossintético, e a água serve como doador de elétrons em uma sequência de reações de oxidação-redução (ver Figura 19-59) fundamental para todos os organismos vivos.

$$R{-}O{-}P(=O)(O^-){-}OH + HO{-}P(=O)(O^-){-}O^- \rightleftharpoons R{-}O{-}P(=O)(O^-){-}O{-}P(=O)(O^-){-}O^- + H_2O$$

(ADP) (ATP)

Fosfoanidrido

**FIGURA 2-23 Participação da água nas reações biológicas.** ATP é um fosfoanidrido formado pela reação de condensação (perda de elementos da água) entre ADP e fosfato. R representa o monofosfato de adenosina (AMP). Esta reação de condensação requer energia. A hidrólise do ATP (adição de elementos da água) para formar ADP e fosfato libera uma quantidade equivalente de energia. Estas reações de condensação e hidrólise do ATP são somente um dos exemplos do papel da água como reagente nos processos biológicos.

### RESUMO 2.4 A água como reagente

- A água é tanto o solvente no qual as reações metabólicas ocorrem quanto um reagente em muitos processos bioquímicos, incluindo hidrólise, condensação e reações de oxidação-redução.

## 2.5 O ajuste do meio aquoso em organismos vivos

Os organismos estão efetivamente adaptados aos seus ambientes aquosos e desenvolveram meios de explorar as propriedades incomuns (peculiares) da água. O alto valor do calor específico da água (a energia térmica necessária para aumentar a temperatura de 1 g de água em 1°C) é útil para células e organismos, pois permite que a água atue como "tampão térmico", mantendo a temperatura de um organismo relativamente constante enquanto a temperatura do meio ambiente flutua e ocorre geração de calor como subproduto do metabolismo. Além disso, alguns vertebrados exploram o alto calor de vaporização da água (Tabela 2-1) pelo uso do excesso de calor do corpo (portanto, perdem calor) para evaporar o suor. O alto grau de coesão interna da água líquida, devido às ligações de hidrogênio, é explorado por plantas como meio de transportar nutrientes das raízes até as folhas durante o processo de transpiração. Até a densidade do gelo, menor que a da água líquida, tem consequências biológicas no ciclo da vida de organismos aquáticos. As lagoas congelam de cima para baixo, e a camada de gelo isola a água de baixo do ar frio, impedindo-a (e os organismos nela) de congelar totalmente. Mais fundamental a

todos os organismos vivos é o fato de muitas propriedades físicas e químicas das macromoléculas celulares, particularmente as proteínas e os ácidos nucleicos, serem derivadas de suas interações com moléculas de água do meio circundante. A influência da água no curso da evolução biológica tem sido determinante e profunda. Se formas de vida se desenvolveram em outro lugar no universo, sua semelhança com as da Terra é improvável, a menos que a água líquida também seja abundante em seu planeta de origem.

## Termos-chave

*Os termos em negrito estão definidos no glossário.*

**ligação de hidrogênio** 48
**energia de dissociação de ligação** 48
**hidrofílico** 50
**hidrofóbico** 50
**anfipático** 52
**micelas** 52
**interações hidrofóbicas** 53
**forças de London** 53
**interações de van der Waals** 53
osmolaridade 56
**osmose** 56
isotônico 56
hipertônico 56
hipotônico 56
**constante de equilíbrio ($K_{eq}$)** 59
**produto iônico da água ($K_w$)** 59
**pH** 60
**acidose** 61
**alcalose** 61
**par ácido-base conjugado** 61
**constante de dissociação ácida ($K_a$)** 62
**p$K_a$** 62
**curva de titulação** 62
**tampão** 64
região de tamponamento 64
**equação de Henderson-Hasselbalch** 64
**condensação** 69
**hidrólise** 69

## Leituras adicionais

### Gerais

**Ball, P.** (2001) *Life's Matrix: A Biography of Water*, University of California Press, Berkeley, CA.
Descrição muito acessível e divertida da água, desde o Big Bang até seus diversos papéis na química da vida.

**Denny, M.W.** (1993) *Air and Water: The Biology and Physics of Life's Media*, Princeton University Press, Princeton, NJ.
Fantástica investigação sobre a relevância biológica das propriedades da água.

**Eisenberg, D. & Kauzmann, W.** (1969) *The Structure and Properties of Water,* Oxford University Press, New York.
Tratamento clássico e avançado sobre as propriedades físico-químicas da água e de interações hidrofóbicas.

**Franks, F. & Mathias, S.F. (eds).** (1982) *Biophysics of Water,* John Wiley & Sons, Inc., New York.
Ampla coleção de artigos sobre a estrutura da água pura e do citoplasma.

**Gerstein, M. & Levitt, M.** (1998) Simulating water and the molecules of life. *Sci. Am.* **279** (November), 100–105.
Descrição bem ilustrada do uso da simulação por computador para estudar as associações biologicamente importantes da água com proteínas e ácidos nucleicos.

**Kandori, H.** (2000) Role of internal water molecules in bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta* **1460**, 177–191.
Revisão de nível intermediário sobre o papel das cadeias internas das moléculas de água no movimento de prótons através dessa proteína.

**Kornblatt, J. & Kornblatt, J.** (1997) The role of water in recognition and catalysis by enzymes. *The Biochemist* **19** (3), 14–17.
Resumo breve e útil sobre os modos pelos quais a água ligada às proteínas influencia a estrutura e a atividade proteica.

**Lemieux, R.U.** (1996) How water provides the impetus for molecular recognition in aqueous solution. *Acc. Chem.* Res **29**, 373-380.
Estudo sobre o papel da água na conexão do açúcar com proteínas.

**Luecke, H.** (2000) Atomic resolution structures of bacteriorhodopsin photocycle intermediates: the role of discrete water molecules in the function of this light-driven íon pump. *Biochim. Biophys. Acta* **1460**, 133–156.
Revisão avançada sobre uma bomba de prótons que utiliza uma cadeia interna de moléculas de água.

**Nicolls, P.** (2000) Introduction: the biology of the water molecule. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 987–992.
Breve revisão sobre as propriedades da água, apresentando muitas revisões avançadas publicadas no mesmo volume (ver especialmente Pocker, 2000, e Rand et al., 2000, adiante).

**Symons, M.C.** (2000) Spectroscopy of aqueous solutions: protein and DNA interactions with water. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 999–1007.

**Wiggins, P.M.** (1990) Role of water in some biological processes. *Microbiol. Rev.* **54**, 432–449.
Revisão sobre a água na biologia, incluindo uma discussão da estrutura física da água líquida, suas interações com biomoléculas, e o estado da água nas células vivas.

### Osmose

**Cayley, D.S., Guttman, H.J., & Record, M.T., Jr.** (2000) Biophysical characterization of changes in amounts and activity of *Escherichia coli* cell and compartment water and turgor pressure in response to osmotic stress. *Biophys. J.* **78**, 1748–1764.
Investigação física avançada da fração de água citoplasmática da bactéria *Escherichia coli* cultivada em meios com osmolaridades diferentes. (Ver também Record et al., 1998, abaixo.)

**Rand, R.P., Parsegian, V.A., & Rau, D.C.** (2000) Intracellular osmotic action. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 1018–1032.
Revisão dos papéis da água na catálise enzimática revelados por estudos em solutos com pouca quantidade de água.

**Record, M.T., Jr., Courtenay, E.S., Cayley, D.S., & Guttman, H.J.** (1998) Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 143–148.
Revisão de nível intermediário sobre os caminhos nos quais uma célula bacteriana se opõe às alterações na osmolaridade do seu ambiente.

**Zonia, L., & Munnik, T.** (2007) Life under pressure: hydrostatic pressure in cell growth and function. *Trends Plant Sci*. **12**, 90–97.

### Interações fracas em sistemas aquosos

**Baldwin, R.L.** (2007) Energetics of protein folding. *J. Mol. Biol.* 371, 282-301.
Discussão avançada dos fatores termodinâmicos, incluindo interações fracas, que determina o curso de dobras de proteínas.

**Ball, P.** (2008) Water as an active constituent in cell biology. *Chem. Rev.* 108, 74-108.
Discussão avançada sobre o papel da água nas estruturas e funções biológicas.

**Blokzijl, W. & Engberts, J.B.F.N.** (1993) Hydrophobic effects. Opinions and facts. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32, 1545-1579.
Análise importante, avançada e monumental.

**Chaplin, M.** (2006) Do we underestimate the importance of water in cell biology? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **7**, 861–866.

**Fersht, A.R.** (1987) The hydrogen bond in molecular recognition. *Trends Biochem. Sci.* **12**, 301–304.
Discussão quantitativa clara e breve da contribuição das ligações de hidrogênio ao reconhecimento molecular e à catálise enzimática.

**Jeffrey, G.A.** (1997) *An Introduction to Hydrogen Bonding,* Oxford University Press, New York.
Discussão avançada e detalhada da estrutura e das propriedades de ligações de hidrogênio, incluindo aquelas na água e nas biomoléculas.

**Kauzmann, W.** (1959) Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* **14**, 1-63.
Conhecimento clássico sobre a importância de interações hidrofóbicas na estabilidade de proteínas.

**Ladbury, J.** (1996) Just add water! The effect of water on the specificity of protein-ligand binding sites and its potential application to drug design. *Chem. Biol.* **3**, 973–980.

**Levy, Y. & Onuchic, J.N.** (2006) Water mediation in protein folding and molecular recognition. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35**, 389–415.
Discussão avançada sobre o papel da água na estrutura das proteínas.

**Martin, T.W. & Derewenda, Z.S.** (1999) The name is bond—H bond. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 403–406.
Breve revisão sobre a evidência de que as ligações de hidrogênio têm algum caráter covalente.

**Pace, C.N.** (2009) Energectics of protein hydrogen bonds. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 681-682.
Breve descrição das contribuições históricas para compreender a força das ligações de hidrogênio em proteínas.

**Pocker, Y.** (2000) Water in enzyme reactions: biophysical aspects of hydration-dehydration processes. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 1008–1017.
Revisão sobre o papel da água na catálise enzimática, com a anidrase carbônica como exemplo de destaque.

**Schwabe, J.W.R.** (1997) The role of water in protein-DNA interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 126–134.
Uma análise do papel da água tanto na especificidade quanto na afinidade de interações entre proteínas e DNA.

**Stillinger, F.H.** (1980) Water revisited. *Science* **209**, 451–457.
Breve revisão da estrutura física da água, incluindo a importância de ligações de hidrogênio e a natureza das interações hidrofóbicas.

**Tanford, C.** (1978) The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science* **200**, 1012–1018.
Clássica revisão sobre as bases químicas e energéticas das interações hidrofóbicas entre biomoléculas em soluções aquosas.

### Ácidos e bases fracas, e tampões: problemas para praticar

**Segel, I.H.** (1976) *Biochemical Calculations*, 2nd edn, John Wiley & Sons, Inc., New York.

## Problemas

**1. Solubilidade do etanol em água.** Explique por que o etanol ($CH_3CH_2OH$) é mais solúvel na água que o etano ($CH_3CH_3$).

**2. Cálculo do pH a partir da concentração do íon hidrogênio.** Qual é o pH de uma solução com concentração de $H^+$ de (a) $1{,}75 \times 10^{-5}$ mol/L; (b) $6{,}50 \times 10^{-10}$ mol/L; (c) $1{,}0 \times 10^{-4}$ mol/L; (d) $1{,}50 \times 10^{-5}$ mol/L?

**3. Cálculo da concentração de íons hidrogênio a partir do pH.** Qual é a concentração de $H^+$ de uma solução com pH de (a) 3,82; (b) 6,52; (c) 11,11?

**4. Acidez do HCl gástrico.** No laboratório de um hospital, uma amostra de 10 mL de suco gástrico, obtida muitas horas depois de uma refeição, foi titulada com 0,1 M NaOH até a neutralidade; foram necessários 7,2 mL de NaOH. O estômago do paciente não continha nenhuma comida ou bebida, então se presume que não exista nenhum tampão presente. Qual era o pH do suco gástrico?

**5. Cálculo do pH de um ácido ou base forte.** (a) Escreva a reação de dissociação ácida para o ácido clorídrico. (b) Calcule o pH de uma solução de $5{,}0 \times 10^{-4}$ M de HCl. (c) Escreva a reação de dissociação ácida para o hidróxido de sódio. (d) Calcule o pH de uma solução de $7{,}0 \times 10^{-5}$ M de NaOH.

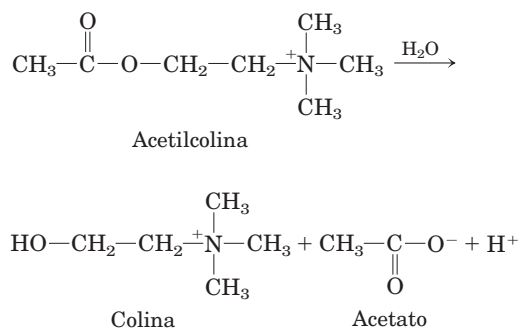
**6. Cálculo do pH a partir da concentração de um ácido forte.** Calcule o pH de uma solução preparada pela diluição de 3,0 mL de HCl 2,5 M até um volume final de 100 mL com água.

**7. Medida dos níveis de acetilcolina pela mudança do pH.** A concentração de acetilcolina (um neurotransmissor) em uma amostra pode ser determinada a partir da mudança de pH que acompanha a sua hidrólise. Quando a amostra é incubada com a enzima acetilcolinesterase, a acetilcolina é convertida a colina e ácido acético, que se dissocia nas formas acetato e íon hidrogênio:

$$CH_3-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-O-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3 \xrightarrow{H_2O}$$

Acetilcolina

$$HO-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3 + CH_3-\underset{\underset{\displaystyle O}{\|}}{C}-O^- + H^+$$

Colina                Acetato

Em uma análise típica, 15 mL de uma solução aquosa contendo uma quantidade desconhecida de acetilcolina tinham pH 7,65. Quando incubada com acetilcolinesterase, o pH da solução diminuiu para 6,87. Supondo que não havia tampão na mistura de teste, determine o número de mols de acetilcolina em 15 mL de amostra.

**8. Significado físico do p$K_a$.** Qual das soluções aquosas seguintes tem o menor pH: 0,1 M de HCl, 0,1 M de ácido acético (p$K_a$ = 4,86), e 0,1 M de ácido fórmico (p$K_a$= 3,75)?

**9. Média de $K_a$ e p$K_a$.** (a) Um ácido forte tem tendência maior ou menor de perder seu próton para um ácido fraco? (b) Um ácido forte tem $K_a$ maior ou menor que um ácido fraco? (c) Um ácido forte tem p$K_a$ maior ou menor que um ácido fraco?

**10. Vinagre simulado.** Uma maneira de fabricar vinagre (*não* a preferida) é pela preparação de uma solução de ácido acético, o único componente ácido do vinagre, em um pH correto (ver Figura 2-15), e a adição de agentes condimentares adequados. O ácido acético ($M_r$ 60) é líquido a 25°C, com densidade de 1,049 g/mL. Calcule o volume que deve ser adicionado à água destilada para fazer 1 L de vinagre simulado (ver Figura 2-16).

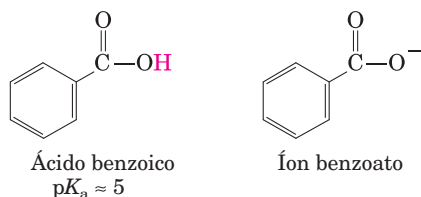
**11. Identificando a base conjugada.** Qual é a base conjugada em cada um dos pares abaixo:

(a) RCOOH, $RCOO^-$ (c) $H_2PO_4^-$, $H_3PO_4$
(b) $RNH_2$, $RNH_3^+$ (d) $H2CO_3$, $HCO_3^-$

**12. Cálculo do pH de uma mistura de um ácido fraco e sua base conjugada.** Calcule o pH de uma solução diluída que contém a razão molar entre o acetato de potássio e o ácido acético ($pK_a$ = 4,76) de: (a) 2:1; (b) 1:3; (c) 5:1; (d) 1:1; (e) 1:10.

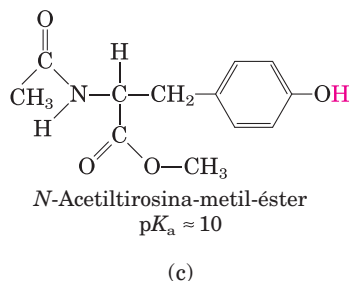
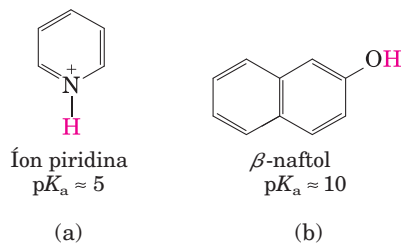
**13. Efeito do pH na solubilidade.** As propriedades altamente polares das ligações de hidrogênio da água a tornam um excelente solvente para espécies iônicas (carregadas). Em contrapartida, moléculas orgânicas não ionizadas e apolares, como benzeno, são relativamente insolúveis em água. Em princípio, a solubilidade aquosa de qualquer ácido ou base orgânica pode ser aumentada pela conversão das moléculas em suas espécies iônicas. Por exemplo, a solubilidade do ácido benzoico em água é baixa. A adição de bicarbonato de sódio em uma mistura de água e ácido benzoico aumenta o pH e desprotona o ácido benzoico, formando benzoato, que é totalmente solúvel em água.

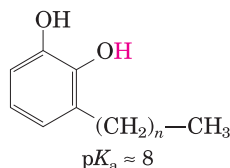
Ácido benzoico
$pK_a \approx 5$

Íon benzoato

Os compostos a seguir são mais solúveis em solução aquosa de 0,1 M de NaOH ou 0,1 M de HCl? (Os prótons dissociados são mostrados em vermelho.)

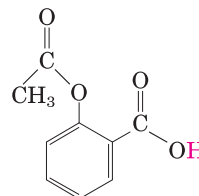
Íon piridina
$pK_a \approx 5$
(a)

$\beta$-naftol
$pK_a \approx 10$
(b)

*N*-Acetiltirosina-metil-éster
$pK_a \approx 10$
(c)

**14. Tratamento de erupções da pele causadas pela hera venenosa.** (*Toxodendron radicans*). Os componentes da hera venenosa que produzem uma coceira característica são catecóis contendo cadeias longas alquil.

$(CH_2)_n$—$CH_3$
$pK_a \approx 8$

Se você fosse exposto à hera venenosa, qual dos tratamentos abaixo você escolheria para aplicar na área afetada? Justifique sua resposta.

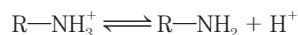
(a) Lavar a área com água fria.
(b) Lavar a área com vinagre diluído ou suco de limão.
(c) Lavar a área com sabão e água.
(d) Lavar a área com sabão, água e bicarbonato de sódio.

**15. pH e absorção de fármacos.** A aspirina é um ácido fraco com $pK_a$ de 3,5 (o H ionizável é mostrado em vermelho):

Ela é absorvida para o sangue pelas células que revestem o estômago e o intestino delgado. A absorção requer a passagem através da membrana plasmática, cuja velocidade é determinada pela polaridade da molécula: moléculas carregadas e altamente polares passam lentamente, enquanto moléculas hidrofóbicas neutras passam rapidamente. O pH do conteúdo estomacal é de cerca de 1,5, e o pH do conteúdo do intestino delgado é de aproximadamente 6. A maior quantidade de aspirina na corrente sanguínea foi absorvida no estômago ou no intestino delgado? Justifique claramente a sua escolha.

**16. Cálculo do pH a partir das concentrações molares.** Qual é o pH de uma solução que contém 0,12 mol/L de $NH_4Cl$ e 0,03 mol/L de NaOH ($pK_a$ do $NH_4^+/NH_3$ é 9,25)?

**17. Cálculo do pH após a titulação com um ácido fraco.** Um composto tem $pK_a$ de 7,4. Em 100 mL de uma solução de 1,0 M desse composto a pH 8,0 é adicionado 30 mL de uma solução 1,0 M de ácido clorídrico. Qual é o pH da solução resultante?

**18. Propriedades de um tampão.** O aminoácido glicina é frequentemente usado como o ingrediente principal de um tampão em experimentos de bioquímica. O grupo amino da glicina, que tem $pK_a$ de 9,6, pode existir tanto na forma protonada (—$NH_3^+$) quanto como base livre (—$NH_2$), devido ao equilíbrio reversível:

$$R—NH_3^+ \rightleftharpoons R—NH_2 + H^+$$

(a) Em qual intervalo de pH a glicina pode ser usada como tampão efetivo devido ao seu grupo amino?

(b) Em uma solução de 0,1 M de glicina em pH 9, qual a fração de glicina que tem os seus grupos amino na forma —$NH_3^+$?

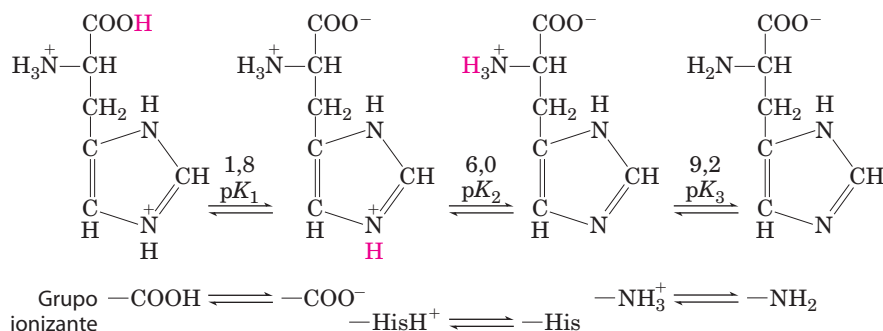
(c) Quanto de KOH 5 M deve ser adicionado em 1 L de uma solução de glicina de 0,1 M a pH 9,0 para mudar o pH para exatamente 10,0?

(d) Quando 99% da glicina estão na forma —$NH_3^+$, qual é a relação numérica entre o pH da solução e o $pK_a$ do grupo amino?

**19. Cálculo do $pK_a$ de um grupo ionizável por titulação.** Os valores $pK_a$ de um composto com dois grupos ionizáveis são $pK_1$ = 4,10 e $pK_2$ entre 7 e 10. Uma bioquímica tem 10 mL de uma solução 1,0 M desse composto com um pH em 8,00. Ela adiciona 10,0 mL de 1,00 M de HCl, o que muda o pH para 3,20. Quanto é $pK_2$?

**20. Cálculo do pH de uma solução de ácido poliprótico.** Histidina tem grupo ionizável com valores $pK_a$ de 1,8; 6,0 e 9,2, como mostrado abaixo (His = grupo imidazol). Uma bioquímica tem 100 mL de uma solução 0,100 M de histidina com pH 5,40. Ela então adiciona 40 mL de 0,10 M HCl. Qual é o pH da solução resultante?

$\overset{+}{H_3N}$—CH(COOH)—$CH_2$—imidazol(H) $\underset{pK_1}{\overset{1,8}{\rightleftharpoons}}$ $\overset{+}{H_3N}$—CH($COO^-$)—$CH_2$—imidazol(H) $\underset{pK_2}{\overset{6,0}{\rightleftharpoons}}$ $\overset{+}{H_3N}$—CH($COO^-$)—$CH_2$—imidazol $\underset{pK_3}{\overset{9,2}{\rightleftharpoons}}$ $H_2N$—CH($COO^-$)—$CH_2$—imidazol

Grupo ionizante —COOH ⇌ —$COO^-$ —$HisH^+$ ⇌ —His —$NH_3^+$ ⇌ —$NH_2$

**21. Cálculo do pH original a partir do pH final após titulação.** Uma bioquímica tem 100 mL de uma solução a 0,10 M de um ácido fraco com $pK_a$ de 6,3. Ela adiciona 6,0 mL de 1,0 M HCl, o que muda o pH para 5,7. Qual é o pH original da solução?

**22. Preparação de um tampão fosfato.** Qual a razão molar de $HPO_4^{2-}$ para $H_2PO_4^-$ em solução que produziria um pH de 7,0? Ácido fosfórico ($H_3PO_4$), um ácido triprótico, tem três valores de $pK_a$: 2,14, 6,86 e 12,4. Dica: somente um dos valores de $pK_a$ é relevante.

**23. Preparação de um tampão-padrão para calibração de um pH-metro.** O eletrodo de vidro usado em pH-metros comerciais fornece uma resposta elétrica proporcional à concentração dos íons de hidrogênio. Para converter essas respostas para uma leitura de pH, o eletrodo deve ser calibrado com soluções padrão de concentração de $H^+$ conhecida. Determine a massa em gramas de fosfato ácido de sódio ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; MM 138) e fosfato de dissódico ($Na_2HPO_2$; MM 142) necessária para preparar 1 L de um tampão padrão a pH 7 com concentração total de fosfato de 0,100 M (ver Figura 2-16). Ver no problema 22 os valores de $pK_a$ do ácido fosfórico.

**24. Cálculo da razão molar entre a base conjugada e o ácido fraco a partir do pH.** Para um ácido fraco com um $pK_a$ de 6, calcule a razão da base conjugada para o ácido em pH 5,0.

**25. Preparação de um tampão de força e pH conhecidos.** Dadas as soluções de 0,10 M de ácido acético ($pK_a$ = 4,76) e acetato de sódio, descreva como você poderia preparar 1,0 L de tampão de acetato de pH 4,0.

**26. Escolha de ácido fraco para tampão.** Qual desses compostos seria o melhor tampão em pH 5,0: ácido fórmico ($pK_a$= 3,8), ácido acético ($pK_a$ = 4,76) ou etilamina ($pK_a$ = 9,0)? Justifique brevemente sua resposta.

**27. Trabalhando com tampões.** Um tampão contém 0,010 mol de ácido láctico ($pK_a$ = 3,86) e 0,050 mol de lactato de sódio por litro. (a) Calcule o pH do tampão. (b) Calcule a mudança no pH quando 5 mL de HCl 0,5 M é adicionado em 1 L de tampão. (c) Que mudança de pH você esperaria se adicionasse a mesma quantidade HCl em 1 L de água pura?

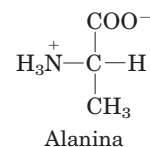
**28. Uso das concentrações molares para cálculo do pH.** Qual é o pH de uma solução que contém 0,20 M de acetato de sódio e 0,60 M de ácido acético. ($pK_a$ = 4,76)?

**29. Preparação de um tampão acetato.** Calcule as concentrações de ácido acético ($pK_a$ = 4,76) e acetato de sódio necessárias para preparar uma solução tampão 0,2 M de pH= 5,0.

**30. pH de uma secreção de defesa de um inseto.** Você já deve ter observado um inseto que se defende dos inimigos pela secreção de um líquido cáustico. Uma análise do líquido mostra uma concentração total de formato mais ácido fórmico ($K_a = 1,8 \times 10^{-4}$) de 1,45 M. A concentração do íon formato é de 0,015 M. Qual é o pH da secreção?

**31. Cálculo de $pK_a$.** Um composto desconhecido, X, tem um grupo carboxílico com $pK_a$ de 2,0 e outro grupo ionizável com $pK_a$ entre 5 e 8. Quando 75 mL de de NaOH 0,1 M é adicionado a 100 mL de uma solução 0,1 M de X em pH 2,0, o pH aumenta para 6,72. Calcule o $pK_a$ do segundo grupo ionizável de X.

**32. Formas iônicas da alanina.** A alanina é um ácido diprótico que pode sofrer duas reações de dissociação (consultar na Tabela 3-1 os valores de $pK_a$). (a) Dada a estrutura parcialmente protonada (ou zwitteriônica; ver Figura 3-9) abaixo, desenhe as estruturas químicas das outras duas formas da alanina que predominam em solução aquosa: a forma totalmente protonada e a forma totalmente desprotonada.

$\overset{+}{H_3N}$—C(H)($COO^-$)($CH_3$)

Alanina

Qual das três formas possíveis da alanina pode estar presente em maior concentração em soluções com os seguintes pH: (b) 1,0; (c) 6,2; (d) 8,02; (e) 11,9. Explique sua resposta de acordo com o pH relacionado aos dois valores de $pK_a$.

**33. Controle do pH sanguíneo pela taxa de respiração.**

(a) A pressão parcial do $CO_2$ nos pulmões pode variar rapidamente pela taxa de respiração e profundidade da respiração. Por exemplo, um remédio comum para aliviar soluços é o aumento da concentração de $CO_2$ nos pulmões. Isso pode ser atingido prendendo a respiração, respirando lenta e superficialmente (hipoventilação) ou respirando dentro de um saco de papel. Sob essas condições, o $pCO_2$ no espaço aéreo dos pulmões sobe acima do normal. Explique em termos qualitativos o efeito desses procedimentos no pH sanguíneo.

(b) Uma prática comum entre competidores de corrida de curta distância é a respiração rápida e profunda (hiperventilação) por cerca de meio minuto para remover o excesso de $CO_2$ de seus pulmões um pouco antes da corrida começar. O pH sanguíneo pode aumentar para 7,6. Explique por que o pH sanguíneo aumenta.

(c) Durante uma corrida de curta distância, os músculos produzem grande quantidade de ácido láctico ($CH_3CH$(OH)

COOH; $K_a = 1{,}38 \times 10^{-4}$ M) a partir da glicose armazenada. Tendo em vista esse fato, por que a hiperventilação antes de uma corrida pode ser útil?

**34. Cálculo de pH sanguíneo a partir dos níveis de $CO_2$ e bicarbonato.** Calcule o pH de uma amostra de plasma sanguíneo com uma concentração de $CO_2$ total de 26,9 mM e de bicarbonato de 25,6 mM. Lembre-se da p. 67, que o p$K_a$ relevante do ácido carbônico é 6,1.

**35. Efeito de prender a respiração no pH sanguíneo.** O pH dos fluidos extracelulares é tamponado pela razão entre bicarbonato e ácido carbônico sanguíneo. Prender a respiração pode aumentar os níveis de $CO_2$ no sangue. Que efeito isso pode ter no pH dos fluidos extracelulares? Explique mostrando a equação(ões) de equilíbrio relevante(s) para esse sistema tampão.

## Problema de análise de dados

**36. Surfactantes "reversíveis"** Moléculas hidrofóbicas não se dissolvem bem em água. Dado que a água é um solvente muito comum, isso torna alguns processos muito difíceis: retirar o resíduo oleoso de alimentos dos pratos, limpar óleo derramado, manter a fase oleosa e a aquosa das saladas bem misturadas e fazer reações químicas que envolvam componentes hidrofílicos e hidrofóbicos.

Surfactantes são uma classe de compostos anfipáticos que incluem sabões, detergentes e emulsificantes. Com o uso de surfactantes, compostos hidrofóbicos podem ser suspensos em soluções aquosas pela formação de micelas (ver Figura 2-7). Uma micela tem um núcleo hidrofóbico consistindo em compostos hidrofóbicos e as "caudas" hidrofóbicas do surfactante; "as cabeças" hidrofílicas do surfactante cobrem a superfície da micela. Uma suspensão de micelas é chamada de emulsão. Quanto mais hidrofílico o grupo que compõe a cabeça do surfactante, mais poderoso ele é, ou seja, maior a sua capacidade de emulsificar material hidrofóbico.

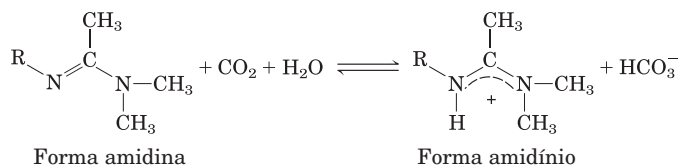
Quando se utiliza sabão para remover a gordura de pratos sujos, o sabão forma uma emulsão com a gordura, facilmente removida pela água por meio das interações com a cabeça hidrofílica das moléculas de sabão. Da mesma forma, um detergente pode ser usado para emulsificar óleo derramado para a remoção com água. E emulsificantes em molhos industrializados de saladas mantêm o óleo suspenso na mistura à base de água.

Existem algumas situações nas quais seria muito útil ter um surfactante "reversível": uma molécula que poderia ser reversivelmente convertida nas formas surfactante e não surfactante.

a) Imagine que esse surfactante coringa exista: como você poderia usá-lo para limpar um derramamento de óleo e depois recuperar o óleo?

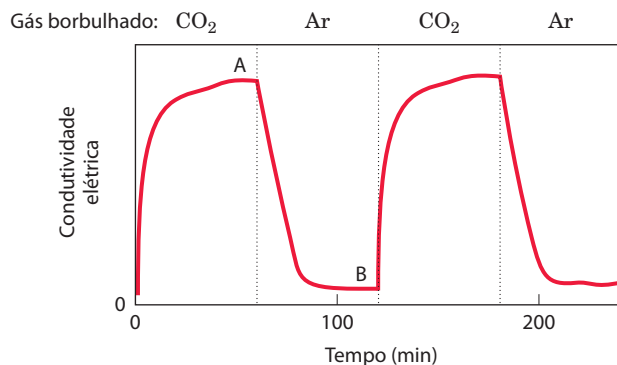
Liu e colaboradores descrevem um protótipo de surfactante reversível no artigo de 2006 "surfactantes reversíveis". A reversibilidade é baseada na seguinte reação:

$$R{-}N{=}C(CH_3){-}N(CH_3){-}CH_3 + CO_2 + H_2O \rightleftharpoons R{-}N(H){\overset{+}{\cdots}}C(CH_3){\cdots}N(CH_3){-}CH_3 + HCO_3^-$$

Forma amidina — Forma amidínio

(b) Dado que o p$K_a$ de um íon amidínio típico é 12,4, em qual direção (esquerda ou direita) você esperaria que o equilíbrio da reação acima de deslocasse? (Ver na Figura 2-16 os valores de p$K_2$ relevantes.) Justifique sua resposta. Dica: lembre-se da reação $H_2O + CO_2 \rightleftharpoons H_2CO_3$.

Liu e colaboradores produziram um surfactante reversível no qual $R = C_{16}H_{33}$. Eles não dão nenhum nome à molécula no artigo, sendo aqui chamada de s-surf.

(c) A forma amidínio do s-surf é um surfactante poderoso; a amidina não é. Explique essa observação.

Liu e colaboradores descobriram que poderiam revezar entre as duas formas do s-surf pela mudança do gás que eles borbulhavam através de uma solução do surfactante. Eles demonstraram essa mudança pela medida da condutividade elétrica da solução de s-surf; soluções aquosas de compostos iônicos apresentam maior condutividade que soluções de compostos não iônicos. Eles começaram com uma solução da forma amidina do s-surf em água. Seus resultados estão demonstrados abaixo; as linhas tracejadas indicam a mudança do gás usado.

(d) Em qual forma a maior parte do s-surf encontra-se no ponto A? E no ponto B?

(e) Por que a condutividade elétrica aumenta do tempo 0 ao ponto A?

(f) Por que a condutividade elétrica decresceu do ponto A para o ponto B?

(g) Explique como você poderia usar s-surf para limpar e recuperar óleo de um derramamento de óleo.

### Referência

**Liu, Y., Jessop, P.G., Cunningham, M., Eckert, C.A., & Liotta, C.L.** (2006) Switchable surfactants. *Science* **313**, 958–960.

# 3

# Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas



Proteínas controlam praticamente todos os processos que ocorrem em uma célula, exibindo uma quase infinita diversidade de funções. Para explorar o mecanismo molecular de um processo biológico, um bioquímico estuda quase que inevitavelmente uma ou mais proteínas. Proteínas são as macromoléculas biológicas mais abundantes, ocorrendo em todas as células e em todas as partes das células. As proteínas também ocorrem em grande variedade; milhares de diferentes tipos podem ser encontrados em uma única célula. Como os árbitros da função molecular, as proteínas são os produtos finais mais importantes das vias de informação discutidas na Parte III deste livro. As proteínas são os instrumentos moleculares pelos quais a informação genética é expressa.

Subunidades monoméricas relativamente simples fornecem a chave da estrutura de milhares de proteínas diferentes. As proteínas de cada organismo, da mais simples das bactérias aos seres humanos, são construídas a partir do mesmo conjunto onipresente de 20 aminoácidos. Como cada um desses aminoácidos tem uma cadeia lateral com propriedades químicas características, esse grupo de 20 moléculas precursoras pode ser considerado o alfabeto no qual a linguagem da estrutura proteica é lida.

Para gerar uma determinada proteína, os aminoácidos se ligam de modo covalente em uma sequência linear característica. O mais marcante é que as células produzem proteínas com propriedades e atividades completamente diferentes ligando os mesmos 20 aminoácidos em combinações e sequências muito diferentes. A partir desses blocos de construção, diferentes organismos podem gerar produtos tão diversos como enzimas, hormônios, anticorpos, transportadores, fibras musculares, proteínas das lentes dos olhos, penas, teias de aranha, chifres de rinocerontes, proteínas do leite, antibióticos, venenos de cogumelos e uma miríade de outras substâncias com atividades biológicas distintas (**Figura 3-1**). Entre esses produtos de proteínas, as enzimas são as mais variadas e especializadas. Como catalisadoras de quase todas as reações celulares, as enzimas são uma das chaves para compreensão da química da vida e, assim, fornecem um ponto central para qualquer curso de bioquímica.

Estruturas e funções de proteínas são os tópicos deste e dos próximos três capítulos. Aqui, primeiro é feita uma descrição das propriedades químicas fundamentais dos aminoácidos, peptídeos e proteínas. Também é abordado como um bioquímico trabalha com proteínas.

(a) 

(b) 

(c) 

**FIGURA 3-1 Algumas funções de proteínas. (a)** A luz produzida por vaga-lumes é o resultado de uma reação envolvendo a proteína luciferina e ATP, catalisada pela enzima luciferase (ver Quadro 13-1). **(b)** Eritrócitos contêm grandes quantidades da proteína transportadora de oxigênio hemoglobina. **(c)** A proteína queratina, produzida por todos os vertebrados, é o componente estrutural principal de pelos, escamas, chifres, lã, unhas e penas. O rinoceronte preto está próximo da extinção em ambiente natural devido à crença encontrada em algumas partes do mundo de que o pó do seu chifre tem propriedades afrodisíacas. Na verdade, as propriedades químicas do pó de chifre de rinoceronte não são diferentes daquelas do pó dos cascos de bovinos e das unhas humanas.

## 3.1 Aminoácidos

**Arquitetura proteica – aminoácidos** Proteínas são polímeros de aminoácidos, com cada **resíduo de aminoácido** unido ao seu vizinho por um tipo específico de ligação covalente (o termo "resíduo" reflete a perda de elementos de água quando um aminoácido é unido a outro). As proteínas podem ser degradadas (hidrolisadas) em seus aminoácidos constituintes por vários métodos, e os estudos mais iniciais de proteínas naturalmente se concentraram nesses aminoácidos livres delas derivados. Vinte aminoácidos diferentes são comumente encontrados em proteínas. O primeiro a ser descoberto foi a asparagina, em 1806. O último dos 20 a ser descoberto (treonina) não havia sido identificado até 1938. Todos os aminoácidos têm nomes comuns ou triviais, em alguns casos derivados da fonte da qual foram primeiramente isolados. A asparagina foi descoberta pela primeira vez no aspargo e o glutamato no glúten do trigo; a tirosina foi isolada a primeira vez a partir do queijo (seu nome é derivado do grego *tyros*, "queijo"); e a glicina (do grego *glykos*, "doce") foi assim denominada devido ao seu sabor adocicado.

### Aminoácidos compartilham características estruturais comuns

Todos os 20 tipos de aminoácidos comuns são $\alpha$-aminoácidos. Eles têm um grupo carboxila e um grupo amino ligados ao mesmo átomo de carbono (o carbono $\alpha$) (**Figura 3-2**). Diferem uns dos outros em suas cadeias laterais ou **grupos R**, que variam em estrutura, tamanho e carga elétrica, e que influenciam a solubilidade dos aminoácidos em água. Além desses 20 aminoácidos, há muitos outros menos comuns. Alguns são resíduos modificados após a síntese de uma proteína; outros são aminoácidos presentes em organismos vivos, mas não como constituintes de proteínas. Foram atribuídas aos aminoácidos comuns das proteínas abreviações de três letras e símbolos de uma letra (Tabela 3-1), utilizados como abreviaturas para indicar a composição e a sequência de aminoácidos polimerizados em proteínas.

**CONVENÇÃO-CHAVE:** O código de três letras é transparente; as abreviações em geral consistem nas três primeiras letras do nome do aminoácido. O código de uma letra foi concebido por Margaret Oakley Dayhoff, considerada por muitos a fundadora do campo da bioinformática. O código de uma letra reflete uma tentativa de reduzir o tamanho dos arquivos de dados (em uma época da computação de cartões perfurados) utilizados para descrever as sequências de aminoácidos. Foi desenvolvido para ser facilmente memorizado, e a compreensão de sua origem pode ajudar os estudantes a fazer exatamente isso. Para seis aminoácidos (CHIMSV), a primeira letra do nome do aminoácido é única e, portanto, utilizada como o símbolo.

Margaret Oakley Dayhoff, 1925–1983

Para cinco outros (AGLPT), a primeira letra não é única, mas é atribuída ao aminoácido mais comum em proteínas (por exemplo, leucina é mais comum do que lisina). Para outros quatro, a letra utilizada é foneticamente sugestiva (RFYW: aRginina, Fenilalanina, tirosina [do inglês *tYrosine*], triptofano [do inglês *tWiptophan*]). Os demais foram mais difíceis de nomear. Para quatro (DNEQ), foram atribuídas letras encontradas em seus nomes ou sugeridas por eles (aspártico [do inglês *asparDic*], asparagiNa, glutâmico [do inglês *glutamEke*], glutamina [do inglês *Q-tamine*]). Faltava a lisina. Sobravam poucas letras no alfabeto, e a letra K foi escolhida porque era a mais próxima de L. ■

Para todos os aminoácidos comuns, exceto a glicina, o carbono $\alpha$ está ligado a quatro grupos diferentes: um grupo carboxila, um grupo amino, um grupo R e um átomo de hidrogênio (Figura 3-2; na glicina, o grupo R é outro átomo de hidrogênio). O átomo de carbono $\alpha$ é, portanto, um **centro quiral** (p. 17). Em decorrência do arranjo tetraédrico dos orbitais de ligação em volta do átomo de carbono $\alpha$, os quatro grupos diferentes podem ocupar dois arranjos espaciais únicos e, portanto, os aminoácidos têm dois estereoisômeros possíveis. Uma vez que elas são imagens especulares não sobreponíveis uma da outra (**Figura 3-3**),

**FIGURA 3-2 Estrutura geral de um aminoácido.** Esta estrutura é comum a todos os tipos de $\alpha$-aminoácidos, exceto um (a prolina, aminoácido cíclico, é a exceção). O grupo R, ou cadeia lateral (roxo), ligado ao carbono $\alpha$ (cinza) é diferente em cada aminoácido.

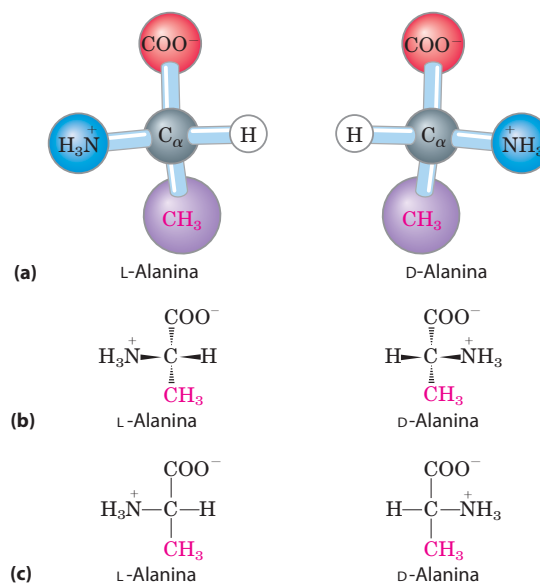



**FIGURA 3-3 Estereoisomerismo em $\alpha$-aminoácidos. (a)** Os dois estereoisômeros da alanina, L– e D–alanina, são imagens especulares não sobrepostas um do outro (enantiômeros). **(b, c)** Duas convenções diferentes para representar as configurações espaciais dos estereoisômeros. Em fórmulas de perspectiva (b), as ligações sólidas em forma de cunha se projetam para fora do plano do papel, com as ligações tracejadas por trás dele. Em fórmulas de projeção (c), assume-se que as ligações horizontais se projetam para fora do plano do papel e as ligações verticais para trás. Entretanto, fórmulas de projeção muitas vezes são usadas casualmente e nem sempre pretendem representar uma configuração estereoquímica específica.

**TABELA 3-1** Propriedades e convenções associadas a aminoácidos comuns encontrados em proteínas

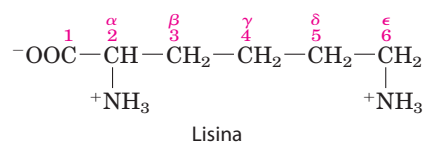
| | | | Valores de p$K_a$ | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Aminoácido | Abreviação/ símbolo | $M_r$* | p$K_1$ (—COOH) | p$K_2$ (—$NH_3^+$) | p$K_R$ (grupo R) | pI | Índice de hidropatia† | Ocorrência em proteínas (%)‡ |
| **Grupos R alifáticos, apolares** | | | | | | | | |
| Glicina | Gly G | 75 | 2,34 | 9,60 | | 5,97 | –0,4 | 7,2 |
| Alanina | Ala A | 89 | 2,34 | 9,69 | | 6,01 | 1,8 | 7,8 |
| Prolina | Pro P | 115 | 1,99 | 10,96 | | 6,48 | –1,6 | 5,2 |
| Valina | Val V | 117 | 2,32 | 9,62 | | 5,97 | 4,2 | 6,6 |
| Leucina | Leu L | 131 | 2,36 | 9,60 | | 5,98 | 3,8 | 9,1 |
| Isoleucina | Ile I | 131 | 2,36 | 9,68 | | 6,02 | 4,5 | 5,3 |
| Metionina | Met M | 149 | 2,28 | 9,21 | | 5,74 | 1,9 | 2,3 |
| **Grupos R aromáticos** | | | | | | | | |
| Fenilalanina | Phe F | 165 | 1,83 | 9,13 | | 5,48 | 2,8 | 3,9 |
| Tirosina | Tyr Y | 181 | 2,20 | 9,11 | 10,07 | 5,66 | –1,3 | 3,2 |
| Triptofano | Trp W | 204 | 2,38 | 9,39 | | 5,89 | –0,9 | 1,4 |
| **Grupos R polares, não carregados** | | | | | | | | |
| Serina | Ser S | 105 | 2,21 | 9,15 | | 5,68 | –0,8 | 6,8 |
| Treonina | Thr T | 119 | 2,11 | 9,62 | | 5,87 | –0,7 | 5,9 |
| Cisteína¶ | Cys C | 121 | 1,96 | 10,28 | 8,18 | 5,07 | 2,5 | 1,9 |
| Asparagina | Asn N | 132 | 2,02 | 8,80 | | 5,41 | –3,5 | 4,3 |
| Glutamina | Gln Q | 146 | 2,17 | 9,13 | | 5,65 | –3,5 | 4,2 |
| **Grupos R carregados positivamente** | | | | | | | | |
| Lisina | Lys K | 146 | 2,18 | 8,95 | 10,53 | 9,74 | –3,9 | 5,9 |
| Histidina | His H | 155 | 1,82 | 9,17 | 6,00 | 7,59 | –3,2 | 2,3 |
| Arginina | Arg R | 174 | 2,17 | 9,04 | 12,48 | 10,76 | –4,5 | 5,1 |
| **Grupos R carregados negativamente** | | | | | | | | |
| Aspartato | Asp D | 133 | 1,88 | 9,60 | 3,65 | 2,77 | –3,5 | 5,3 |
| Glutamato | Glu E | 147 | 2,19 | 9,67 | 4,25 | 3,22 | –3,5 | 6,3 |

*Os valores de $M_r$ refletem as estruturas como mostradas na Figura 3-5. Os elementos da água ($M_r$ 18) são removidos quando o aminoácido é incorporado a um polipeptídeo.
†Uma escala combinando hidrofobicidade e hidrofilicidade de grupos R. Os valores refletem a energia livre ($\Delta G$) de transferência da cadeia lateral do aminoácido de um solvente hidrofóbico para a água. Esta transferência é favorável ($\Delta G < 0$; valor negativo no índice) para cadeias laterais de aminoácidos carregadas ou polares, e desfavorável ($\Delta G > 0$; valor positivo no índice) para aminoácidos com cadeias laterais apolares ou mais hidrofóbicas. Ver o Capítulo 11. A partir de Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.
‡Ocorrência média em mais de 1.150 proteínas. De Doolittle, R.F. (1989) *Redundancies in protein sequences.* Em *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation* (Fasman, G.D., ed.), pp. 599-623, Plenum Press, New York.
¶Em geral, a cisteína é classificada como polar apesar de apresentar um índice hidropático positivo. Isso reflete a capacidade do grupo sulfidril em atuar como ácido fraco e formar uma fraca ligação de hidrogênio com o oxigênio ou nitrogênio.

as duas formas representam uma classe de estereoisômeros denominada **enantiômeros** (ver Figura 1–20). Todas as moléculas com um centro quiral também são **opticamente ativas** – isto é, elas giram o plano da luz polarizada (ver Quadro 1–2).

**CONVENÇÃO-CHAVE:** Duas convenções são utilizadas para identificar os carbonos em um aminoácido – prática que pode ser confusa. Os carbonos adicionais em um grupo R são comumente designados como $\beta$, $\gamma$, $\delta$, $\varepsilon$, e assim por diante, a partir do carbono $\alpha$. Para a maioria das outras moléculas orgânicas, os átomos de carbono são simplesmente numerados a partir de uma extremidade, conferindo a mais alta prioridade (C-1) ao carbono com o substituinte contendo o átomo de maior número atômico. Nessa última convenção, o carbono carboxílico de um aminoácido seria o C-1 e o carbono $\alpha$ seria o C-2.

$$\overset{1}{^{-}OOC}-\overset{\overset{\alpha}{2}}{\underset{|\atop {^+NH_3}}{CH}}-\overset{\overset{\beta}{3}}{CH_2}-\overset{\overset{\gamma}{4}}{CH_2}-\overset{\overset{\delta}{5}}{CH_2}-\overset{\overset{\epsilon}{6}}{\underset{|\atop {^+NH_3}}{CH_2}}$$

Lisina

Em alguns casos, como aminoácidos com grupos R heterocíclicos (tal como a histidina), o sistema de letras gregas é ambíguo e a convenção numérica é então utilizada. Para aminoácidos de cadeias laterais ramificadas, carbonos equivalentes recebem números após as letras gregas. Leucina, portanto, tem carbonos $\delta$1 e $\delta$2 (ver a estrutura na Figura 3-5). ■

Uma nomenclatura especial foi desenvolvida para especificar a **configuração absoluta** dos quatro substituintes dos átomos de carbono assimétricos. As configurações absolutas de açúcares simples e de aminoácidos são especificadas pelo **sistema D, L** (**Figura 3-4**), com base na configuração absoluta do açúcar de três carbonos gliceraldeído, uma convenção proposta por Emil Fischer em 1891 (Fischer sabia que grupos circundavam o carbono assimétrico do gliceraldeído, mas teve de supor sua configuração absoluta; ele supôs corretamente, como foi confirmado posteriormente por análises de difração de raios x). Para todos os compostos quirais, os estereoisômeros com configuração relacionada àquela do L-gliceraldeído são designados L, e os estereoisômeros relacionados ao D-gliceraldeído foram designados D. Os grupos funcionais de L-alanina são combinados com aqueles de L-gliceraldeído pelo alinhamento daqueles que podem ser interconvertidos por reações químicas simples, de etapa única. Portanto, o grupo carboxila de L-alanina ocupa a mesma posição ao redor do carbono quiral que o grupo aldeído de L-gliceraldeído, porque um aldeído é prontamente convertido em um grupo carboxila por meio de uma oxidação de etapa única. Historicamente, as designações semelhantes L e D eram utilizadas para levorrotatória (rotação da luz polarizada à esquerda) e dextrorrotatória (rotação da luz polarizada à direita). Entretanto, nem todos os L-aminoácidos são levorrotatórios, e a convenção mostrada na Figura 3-4 foi necessária para evitar potenciais ambiguidades sobre a configuração absoluta. Pela convenção de Fischer, L e D se referem *apenas* à configuração absoluta dos quatro substituintes em torno do carbono quiral, e não às propriedades ópticas da molécula.

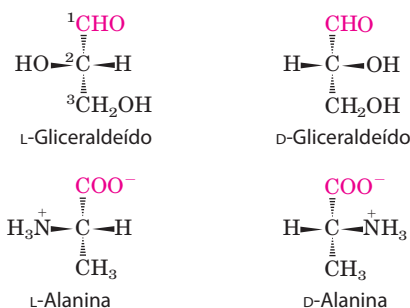
L-Gliceraldeído D-Gliceraldeído

L-Alanina D-Alanina

**FIGURA 3-4 Relação estérica dos estereoisômeros de alanina à configuração absoluta do L-gliceraldeído e do D-gliceraldeído.** Nestas fórmulas em perspectiva, os carbonos são alinhados verticalmente, com o átomo quiral no centro. Os carbonos nestas moléculas são numerados de 1 a 3, de cima para baixo, começando com o carbono do aldeído ou carboxiterminal (vermelho), como mostrado. Quando apresentado desta maneira, o grupo R do aminoácido (nesse caso o grupo metil da alanina) está sempre abaixo do carbono $\alpha$. Os L-aminoácidos são aqueles com o grupo $\alpha$-amino na esquerda e os D-aminoácidos com esse grupo na direita.

Outro sistema para especificar a configuração ao redor de um centro quiral é o **sistema RS,** utilizado na nomenclatura sistemática da química orgânica para descrever, com mais exatidão, a configuração das moléculas com mais de um centro quiral (p. 18).

## Os resíduos de aminoácidos em proteínas são estereoisômeros L

Quase todos os compostos biológicos com centro quiral ocorrem naturalmente em apenas uma forma estereoisomérica, D ou L. Os resíduos de aminoácidos em moléculas proteicas são exclusivamente estereoisômeros L. Os resíduos de D-aminoácidos foram encontrados apenas em alguns peptídeos, geralmente pequenos, incluindo alguns peptídeos de paredes celulares bacterianas e certos antibióticos peptídicos.

É notável que praticamente todos os resíduos de aminoácidos em proteínas sejam estereoisômeros L. Quando compostos quirais são formados em reações químicas comuns, o resultado é uma mistura racêmica de isômeros D e L, os quais são difíceis para um químico distinguir e separar. Contudo, para um sistema vivo, os isômeros D e L são tão diferentes entre si quanto a mão direita é diferente da esquerda. A formação de subestruturas repetidas estáveis em proteínas (Capítulo 4) geralmente exige que seus aminoácidos constituintes sejam de uma série estereoquímica. As células são capazes de sintetizar especificamente os isômeros L de aminoácidos porque os sítios ativos de enzimas são assimétricos, tornando estereoespecíficas as reações por elas catalisadas.

## Aminoácidos podem ser classificados pelo grupo R

O conhecimento das propriedades químicas dos aminoácidos comuns é fundamental para a compreensão da bioquímica. O tópico pode ser simplificado agrupando-se os aminoácidos em cinco classes principais com base nas propriedades dos seus grupos R (Tabela 3-1), particularmente sua **polaridade** ou tendência para interagir com a água em pH biológico (próximo do pH 7,0). A polaridade dos grupos R varia amplamente, de apolar e hidrofóbico (não hidrossolúvel) ao altamente polar e hidrofílico (hidrossolúvel). Alguns aminoácidos são um pouco difíceis de caracterizar ou não se encaixam perfeitamente em qualquer grupo, particularmente glicina, histidina e cisteína. Suas atribuições a determinados grupos são o resultado de avaliações ponderadas em vez de absolutas.

As estruturas dos 20 aminoácidos comuns são mostradas na **Figura 3-5**, e algumas de suas propriedades são listadas na Tabela 3-1. Em cada classe há gradações de polaridade, tamanho e forma dos grupos R.

**Grupos R apolares, alifáticos** Os grupos R nesta classe de aminoácidos são apolares e hidrofóbicos. As cadeias laterais de **alanina**, **valina**, **leucina** e **isoleucina** tendem a se agrupar no interior de proteínas, estabilizando a estrutura proteica por meio de interações hidrofóbicas. A **glicina** tem a estrutura mais simples. Embora seja mais facilmente agrupada com os aminoácidos apolares, sua cadeia lateral

Grupos R aromáticos

Fenilalanina

Tirosina

Triptofano

Grupos R carregados negativamente

Aspartato

Glutamato

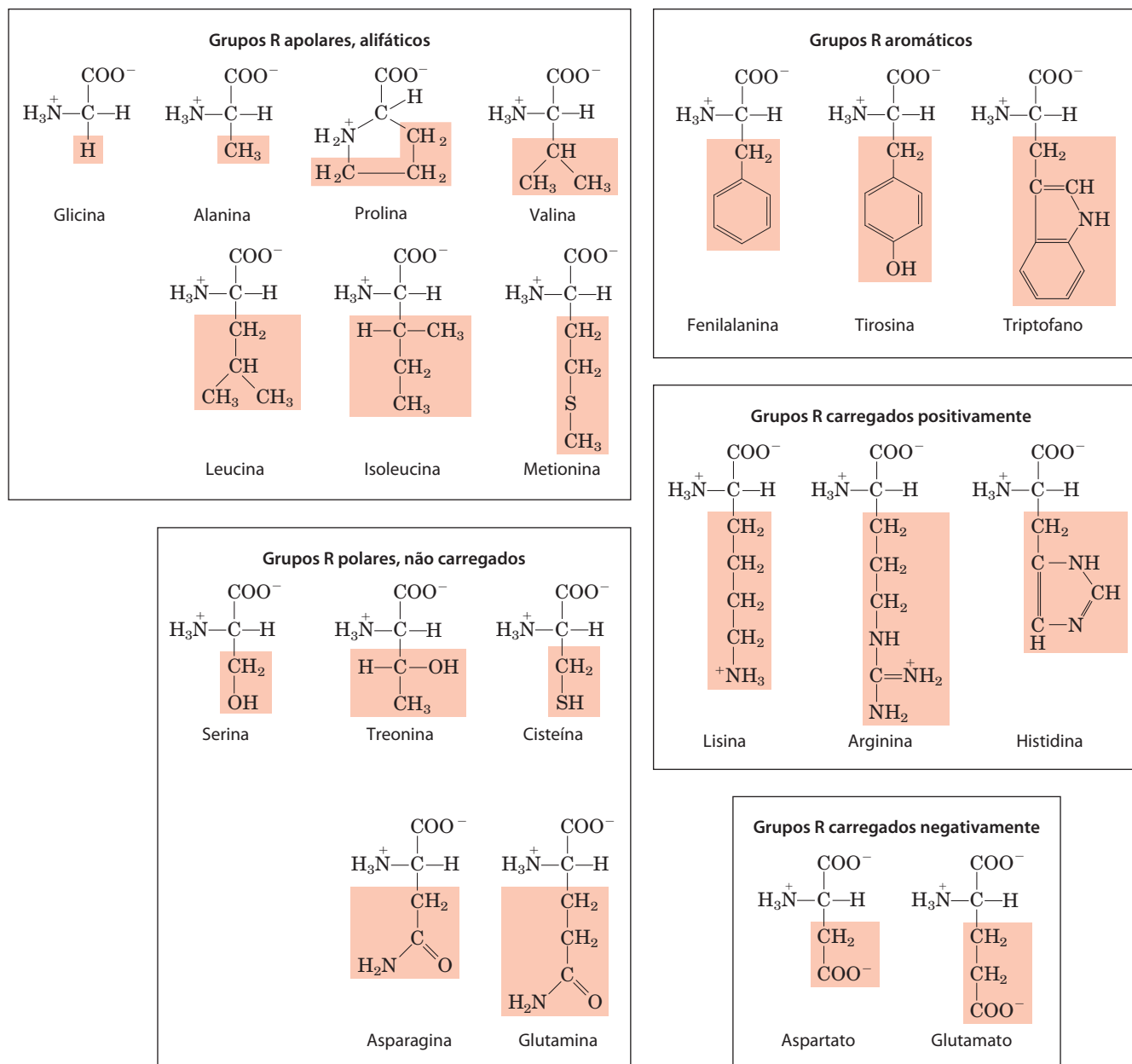



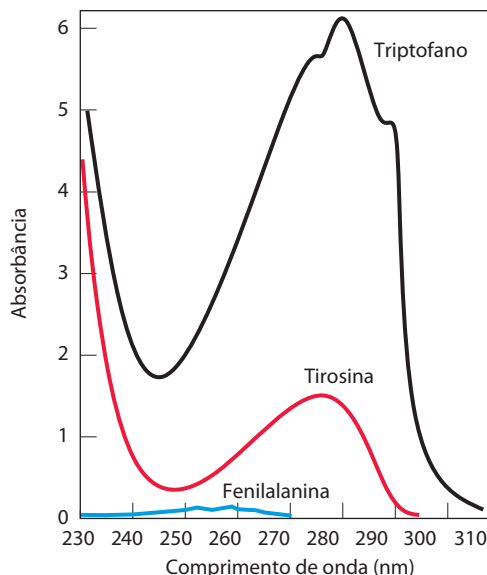
**FIGURA 3-5 Os 20 aminoácidos comuns de proteínas.** As fórmulas estruturais mostram o estado de ionização que predomina em pH 7,0. As porções não sombreadas são aquelas comuns a todos os aminoácidos; aquelas sombreadas são os grupos R. Embora o grupo R da histidina seja mostrado sem carga, seu p$K_a$ (ver a Tabela 3-1) é tal que uma pequena mas significativa fração desses grupos seja positivamente carregada em pH 7,0. A forma protonada da histidina é mostrada acima do gráfico na Figura 3-12b.

muito pequena não contribui realmente para interações hidrofóbicas. A **metionina**, um dos dois aminoácidos que contém enxofre, tem um grupo tioéter ligeiramente apolar em sua cadeia lateral. A **prolina** tem cadeia lateral alifática com estrutura cíclica distinta. O grupo amino secundário (imino) de resíduos de prolina é mantido em uma configuração rígida que reduz a flexibilidade estrutural de regiões polipeptídicas contendo prolina.

**Grupos R aromáticos** **Fenilalanina**, **tirosina** e **triptofano**, com suas cadeias laterais aromáticas, são relativamente apolares (hidrofóbicos). Todos podem participar em interações hidrofóbicas. O grupo hidroxila da tirosina pode formar ligações de hidrogênio e é um importante grupo funcional em algumas enzimas. A tirosina e o triptofano são significativamente mais polares do que a fenilalanina, devido ao grupo hidroxila da tirosina e ao nitrogênio do anel indol do triptofano.

O triptofano, a tirosina e, em menor extensão, a fenilalanina, absorvem a luz ultravioleta (**Figura 3-6**; ver também Quadro 3-1). Isso explica a forte absorbância de luz com comprimento de onda de 280 nm característica da maior parte das proteínas, propriedade explorada por pesquisadores na caracterização de proteínas.

**Grupos R polares, não carregados** Os grupos R desses aminoácidos são mais solúveis em água, ou mais hidrofílicos do que aqueles dos aminoácidos apolares, porque eles contêm grupos funcionais que formam ligações de hidrogênio com a água. Essa classe de aminoácidos inclui a **serina**, **treonina**, **cisteína**, **asparagina** e **glutamina**. Os grupos hidroxila da serina e treonina e os grupos amida da asparagina e glutamina contribuem para suas polaridades. A cisteína é um caso isolado aqui porque sua polaridade, devida ao seu grupo sulfidrila, é bastante modesta. A cisteína é um ácido

**FIGURA 3-6 Absorção da luz ultravioleta por aminoácidos aromáticos.** Comparação dos espectros de absorção de luz dos aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina em pH 6,0. Os aminoácidos estão presentes em quantidades equimolares ($10^{-3}$M) sob condições idênticas. A absorbância medida do triptofano é mais do que quatro vezes aquela da tirosina em um comprimento de onda de 280 nm. Observe que a absorção luminosa máxima tanto para o triptofano quanto para a tirosina ocorre próxima de 280 nm. A absorção luminosa pela fenilalanina geralmente contribui pouco para as propriedades espectroscópicas das proteínas.

## QUADRO 3-1 MÉTODOS Absorção de luz por moléculas: a Lei de Lambert-Beer

Uma ampla variedade de biomoléculas absorve a luz em comprimentos de onda característicos, como o triptofano, que absorve a luz em 280 nm (ver Figura 3-6). A medida da absorção da luz por um espectrofotômetro é utilizada para detectar e identificar moléculas e para determinar suas concentrações em solução. A fração da luz incidente absorvida por uma solução em um determinado comprimento de onda está relacionada à espessura da camada de absorção (comprimento do caminho) e à concentração da substância que absorve (Figura 1). Essas duas relações são combinadas na lei de Lambert-Beer,

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon c l$$

em que $I_0$ é a intensidade da luz incidente, $I$ é a intensidade da luz transmitida, a relação $I/I_0$ (o inverso da razão na equação) é a transmitância, $\varepsilon$ é o coeficiente de extinção molar (em unidades de litros por mol por centímetro), $c$ é a concentração da substância absorvida (em mols por litro), e $l$ é o comprimento do caminho de luz da amostra absorvente de luz (em centímetros).

A lei de Lambert-Beer pressupõe que a luz incidente é paralela e monocromática (de um único comprimento de onda) e que as moléculas de solvente e soluto são orientadas aleatoriamente. A expressão log ($I_0/I$) é denominada **absorbância** e designada $A$.

É importante observar que cada milímetro sucessivo do comprimento do caminho da solução absorvente em uma célula de 1,0 cm não absorve uma quantidade constante, mas uma fração constante da luz que incide sobre ela. Entretanto, com uma camada absorvente de comprimento de caminho fixo, *a absorbância,* A, *é diretamente proporcional à concentração do soluto absorvente.*

O coeficiente de extinção molar varia com a natureza do composto absorvente, do solvente e do comprimento de onda, e também com o pH se a substância que absorve a luz está em equilíbrio com um estado de ionização que possui diferentes propriedades de absorção.

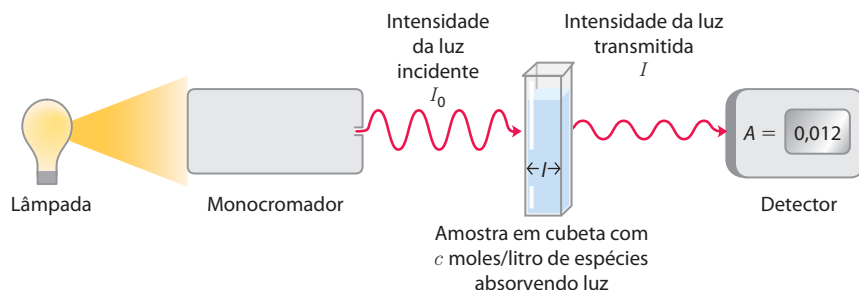



**FIGURA Q-1** Os principais componentes de um espectrofotômetro. A fonte de luz emite luz em um amplo espectro, quando o monocromador seleciona e transmite luz de um comprimento de onda específico. A luz monocromática passa através da amostra em uma cubeta de tamanho $l$ e é absorvida pela amostra como uma proporção da concentração das espécies absorvendo luz. A luz transmitida é medida por um detector.

Cisteína

Cisteína

$2H^+ + 2e^-$

$2H^+ + 2e^-$

Cistina

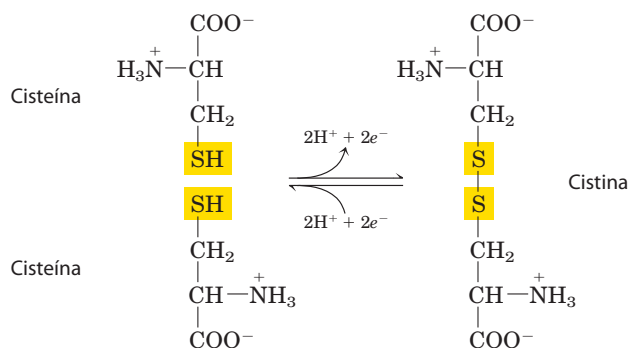



**FIGURA 3-7 Formação reversível de uma ligação dissulfeto pela oxidação de duas moléculas de cisteína.** Ligações de dissulfeto entre resíduos Cys estabilizam as estruturas de muitas proteínas.

fraco e pode fazer fracas ligações de hidrogênio com o oxigênio ou nitrogênio.

A asparagina e a glutamina são as amidas de dois outros aminoácidos também encontrados em proteínas – aspartato e glutamato, respectivamente – nos quais a asparagina e a glutamina são facilmente hidrolisadas por ácido ou base. A cisteína é prontamente oxidada para formar um aminoácido dimérico ligado de modo covalente chamado **cistina**, no qual duas moléculas ou resíduos de cisteína são ligadas por uma ligação dissulfeto (**Figura 3-7**). Os resíduos ligados a dissulfetos são fortemente hidrofóbicos (apolares).

As ligações dissulfeto desempenham um papel especial nas estruturas de muitas proteínas pela formação de ligações covalentes entre partes de uma molécula polipeptídica ou entre duas cadeias polipeptídicas diferentes.

**Grupos R carregados positivamente (básicos)** Os grupos R mais hidrofílicos são aqueles carregados positivamente ou negativamente. Os aminoácidos nos quais os grupos R têm uma carga positiva significativa em pH 7,0 são a **lisina**, com um segundo grupo amino primário na posição $\varepsilon$ em sua cadeia alifática; a **arginina**, com um grupo guanidínio positivamente carregado; e a **histidina**, com um grupo imidazol aromático. Como o único aminoácido comum que tem uma cadeia lateral ionizável com p$K_a$ próximo da neutralidade, a histidina pode ser positivamente carregada (forma protonada) ou não carregada em pH 7,0. Seus resíduos facilitam muitas reações catalisadas por enzimas, funcionando como doadores/aceptores de prótons.

**Grupos R carregados negativamente (ácidos)** Os dois aminoácidos que apresentam grupos R com carga negativa final em pH 7,0 são o **aspartato** e o **glutamato**, cada um dos quais tem um segundo grupo carboxila.

## Aminoácidos incomuns também têm funções importantes

Além dos 20 aminoácidos comuns, as proteínas podem conter resíduos criados por modificações de resíduos comuns já incorporados em um polipeptídeo (**Figura 3-8a**). Entre esses aminoácidos incomuns estão a **4-hidroxiprolina**, um derivado da prolina, e a **5-hidroxilisina**, derivada da lisina. O primeiro é encontrado em proteínas da parede celular de células vegetais e ambos são encontrados no colágeno, proteína fibrosa de tecidos conectivos. A **6-*N*-metil-lisina** é um constituinte da miosina, uma proteína contrátil do músculo. Outro aminoácido incomum importante é o **$\gamma$-carboxiglutamato**, encontrado na proteína de coagulação protrombina e em algumas outras proteínas que se ligam ao $Ca^{2+}$ como parte de suas funções biológicas. Mais complexa é a **desmosina**, derivada de quatro resíduos Lys, encontrada na proteína fibrosa elastina.

A **selenocisteína** é um caso especial. Esse raro resíduo de aminoácido é introduzido durante a síntese proteica, em vez de criado por uma modificação pós-sintética. Contém selênio em vez do enxofre da cisteína. Na verdade derivada de serina, a selenocisteína é um constituinte de apenas algumas poucas proteínas conhecidas.

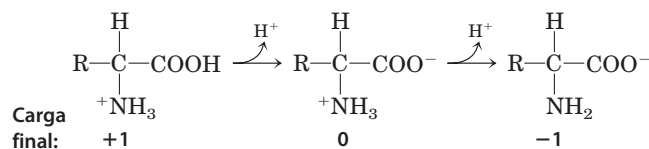
Alguns resíduos de aminoácidos em uma proteína podem ser modificados transitoriamente para alterar as funções da proteína. A adição de grupos fosforil, metil, acetil, adenilil, ADP-ribosil ou outros grupos a resíduos de aminoácidos específicos pode aumentar ou diminuir a atividade de uma proteína (Figura 3-8b). A fosforilação é uma modificação reguladora particularmente comum. A modificação covalente como uma estratégia reguladora em uma proteína é discutida com mais detalhe no Capítulo 6.

Cerca de 300 aminoácidos adicionais foram encontrados nas células. Eles têm várias funções, mas não são todos constituintes de proteínas. A **ornitina** e a **citrulina** (Figura 3-8c) merecem atenção especial porque são intermediários-chave (metabólitos) na biossíntese de arginina (Capítulo 22) e no ciclo da ureia (Capítulo 18).

## Aminoácidos podem agir como ácidos e bases

Os grupos amino e carboxila de aminoácidos, em conjunto com os grupos ionizáveis R de alguns aminoácidos, funcionam como ácidos e bases fracos. Quando um aminoácido sem um grupo R ionizável é dissolvido em água em pH neutro, ele permanece na solução como um íon bipolar, ou **zwitteríon** (do alemão "íon híbrido"), que pode agir como ácido ou base (**Figura 3-9**). Substâncias com essa natureza dupla (ácido-base) são **anfotéricas** e são frequentemente chamadas de **anfólitos** (a partir de "eletrólitos anfotéricos"). Um simples $\alpha$-aminoácido monoamino monocarboxílico, como a alanina, é um ácido diprótico quando completamente protonado; ele tem dois grupos, o grupo —COOH e o grupo $—NH_3^+$, que pode produzir dois prótons:

$$R{-}CH(^+NH_3){-}COOH \xrightarrow{H^+} R{-}CH(^+NH_3){-}COO^- \xrightarrow{H^+} R{-}CH(NH_2){-}COO^-$$

Carga final: +1, 0, −1

## Aminoácidos têm curvas de titulação características

A titulação ácido-base envolve a adição ou remoção gradual de prótons (Capítulo 2). A **Figura 3-10** mostra a curva de titulação de uma forma diprótica de glicina.

Fosfosserina

Fosfotreonina

Fosfotirosina

σ-*N*-Metil-arginina

6-*N*-Acetilisina

Éster de metil-glutamato

Adenililtirosina

(b)

Ornitina

Citrulina

(c)

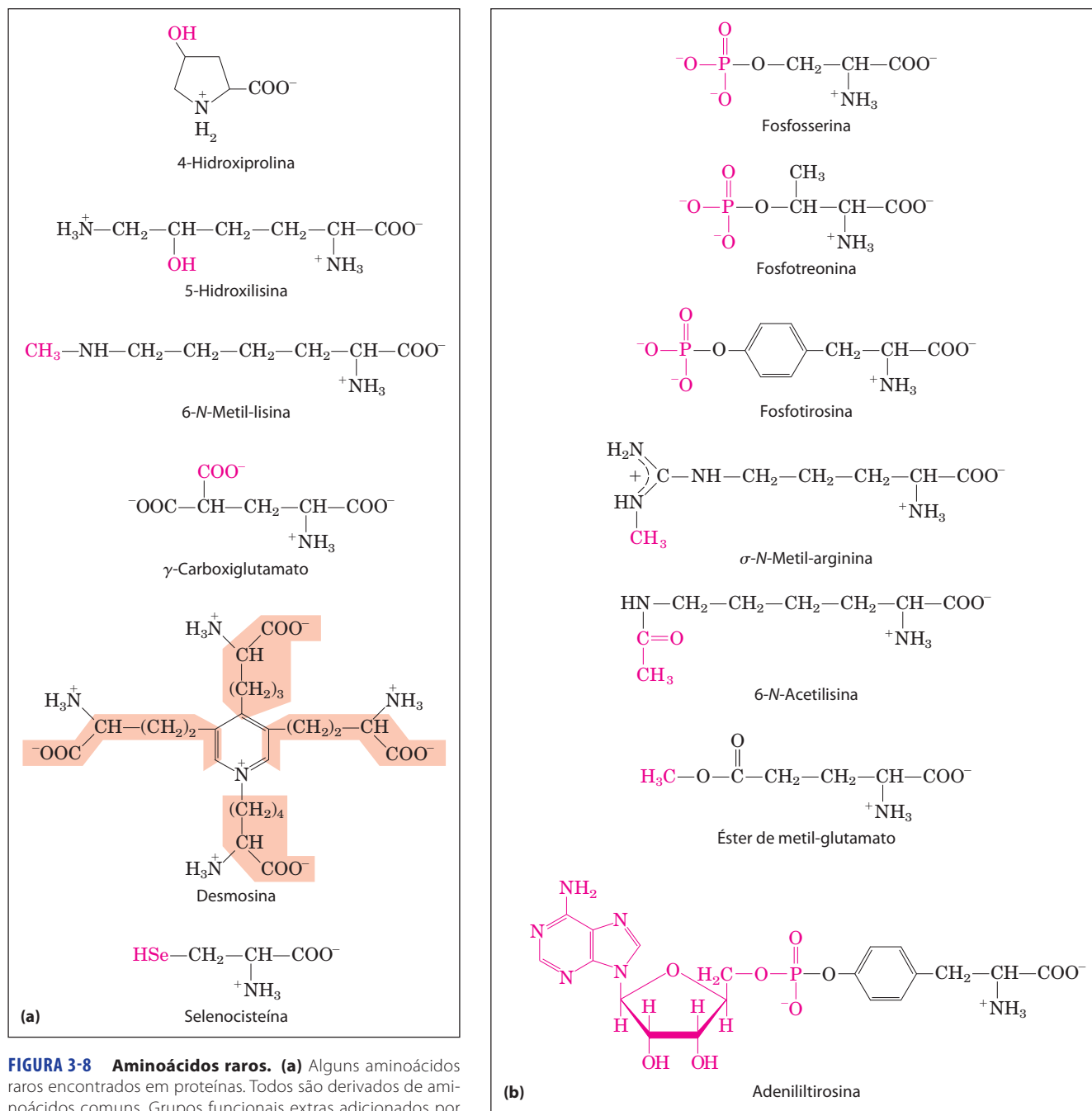
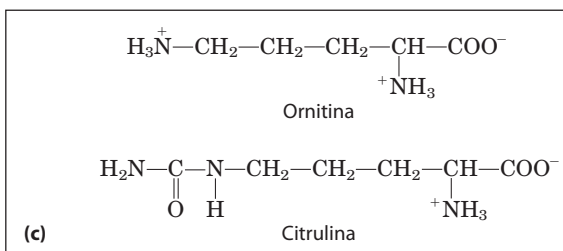



**FIGURA 3-8 Aminoácidos raros. (a)** Alguns aminoácidos raros encontrados em proteínas. Todos são derivados de aminoácidos comuns. Grupos funcionais extras adicionados por reações de modificação são mostrados em vermelho. A desmosina é formada a partir de quatro resíduos Lys (os esqueletos de carbono estão sombreados). Observe o uso tanto de números quanto de letras gregas nos nomes dessas estruturas para identificar os átomos de carbono alterados. **(b)** Modificações dos aminoácidos reversíveis envolvidos na regulação da atividade proteica. A fosforilação é o tipo mais comum de modificação regulatória. **(c)** Ornitina e citrulina, não encontrados em proteínas, são intermediários na biossíntese de arginina e no ciclo da ureia.

Os dois grupos ionizáveis de glicina, o grupo carboxila e o grupo amino, são titulados com uma base forte, como NaOH. O gráfico tem duas fases distintas, correspondendo à desprotonação de dois grupos diferentes na glicina. Cada uma das duas fases se assemelha ao formato da curva de titulação de um ácido monoprótico, como o

$$\mathrm{R{-}CH(NH_2){-}COOH}$$
Forma não iônica

$$\mathrm{R{-}CH({}^{+}NH_3){-}COO^-}$$
Forma zwitteriônica

$$\mathrm{R{-}CH({}^{+}NH_3){-}COO^-} \rightleftharpoons \mathrm{R{-}CH(NH_2){-}COO^-} + \mathrm{H^+}$$
Zwitteríon como ácido

$$\mathrm{R{-}CH({}^{+}NH_3){-}COO^-} + \mathrm{H^+} \rightleftharpoons \mathrm{R{-}CH({}^{+}NH_3){-}COOH}$$
Zwitteríon como base

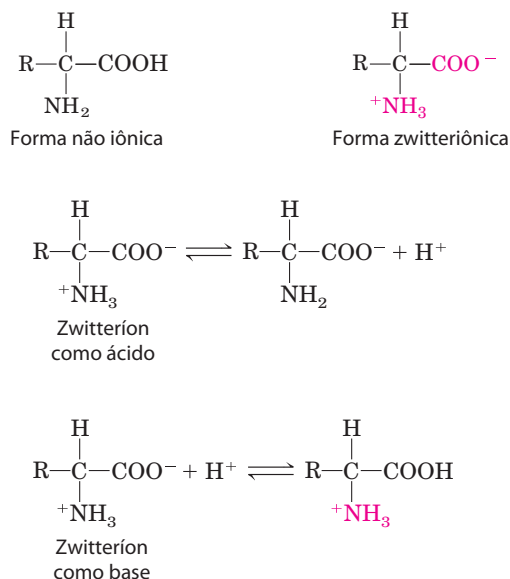



**FIGURA 3-9 Formas não iônicas e zwitteriônicas de aminoácidos.** A forma não iônica não ocorre em quantidades significativas em soluções aquosas. O zwitteríon predomina em pH neutro. Um zwitteríon pode atuar tanto como ácido (doador de prótons) quanto como base (aceptor de prótons).

**FIGURA 3-10 Titulação de um aminoácido.** Aqui é mostrada a curva de titulação de 0,1 M de glicina a 25ºC. As espécies iônicas que predominam em pontos-chave na titulação são mostradas acima do gráfico. Os retângulos sombreados, centrados em torno de p$K_1$ = 2,34 e p$K_2$ = 9,60, indicam as regiões de maior poder de tamponamento. Observe que 1 equivalente de $OH^-$ = 0,1 M de NaOH foi adicionado.

ácido acético (ver Figura 2–17), e pode ser analisada do mesmo modo. Em pH muito baixo, a espécie iônica predominante de glicina é a forma completamente protonada, $^+H_3N—CH_2—COOH$. No primeiro estágio da titulação, o grupo —COOH de glicina perde seu próton. No ponto médio desse estágio, estão presentes concentrações equimolares de espécies doadoras ($^+H_3N—CH_2—COOH$) e aceptoras ($^+H_3N—CH_2—COO^-$) de prótons. Como na titulação de qualquer ácido fraco, um ponto de inflexão é alcançado nesse ponto médio onde o pH é igual ao p$K_a$ do grupo protonado que está sendo titulado (ver Figura 2-18). Para a glicina, o pH no ponto médio é 2,34, portanto seu grupo —COOH tem um p$K_a$ (marcado p$K_1$ na Figura 3-10) de 2,34 (lembre-se do Capítulo 2 que pH e p$K_a$ são simplesmente notações convenientes para concentração de prótons e a constante de equilíbrio para ionização, respectivamente. O p$K_a$ é uma medida da tendência de um grupo doar um próton, com essa tendência diminuindo dez vezes à medida que o p$K_a$ aumenta em uma unidade). À medida que a titulação da glicina prossegue, outro ponto importante é alcançado no pH 5,97. Aqui há outro ponto de inflexão, no qual a remoção do primeiro próton está completa e a remoção do segundo apenas começou. Nesse pH, a glicina está presente em grande parte como o íon bipolar (zwitteríon) $^+H_3N—CH_2—COO^-$. Em breve será analisado o significado desse ponto de inflexão na curva de titulação (marcado como pI na Figura 3-10).

O segundo estágio da titulação corresponde à remoção de um próton do grupo $—NH_3^+$ da glicina. O pH no ponto médio dessa fase é 9,60, igual ao p$K_a$ (marcado p$K_2$ na Figura 3-10) para o grupo $—NH_3^+$. A titulação está completa em um pH de cerca de 12, no ponto em que a forma predominante de glicina é $H_2N—CH_2—COO^-$.

A partir da curva de titulação da glicina, é possível obter várias informações importantes. Em primeiro lugar, ela fornece uma medida quantitativa do p$K_a$ de cada um dos dois grupos ionizáveis: 2,34 para o grupo —COOH e 9,60 para o grupo $—NH_3^+$. Observe que o grupo carboxila da glicina é mais de cem vezes mais ácido (mais facilmente ionizado) do que o grupo carboxila do ácido acético, que, como foi visto no Capítulo 2, tem um p$K_a$ de 4,76 – próximo da média para um grupo carboxila ligado a um hidrocarboneto alifático não substituído. O p$K_a$ alterado da glicina é provocado pela repulsão entre o próton que está saindo e o grupo amino próximo positivamente carregado no átomo de carbono $\alpha$, como descrito na **Figura 3-11**. As cargas opostas no zwitteríon resultante estão estabilizadas. De modo semelhante, o p$K_a$ do grupo amino na glicina é alterado para baixo em relação ao p$K_a$ médio de um grupo amino. Esse efeito se deve parcialmente aos átomos de oxigênio eletronegativos nos grupos carboxila, que tendem a puxar os elétrons na direção deles, aumentando a tendência do grupo amino em abrir mão de um próton. Assim, o grupo $\alpha$-amino tem um p$K_a$ menor do que o de um de uma amina alifática, como a metilamina (Figura 3-11). Em resumo, o p$K_a$ de qualquer grupo funcional é em grande parte afetado por seu ambiente químico, fenômeno algumas vezes explorado nos sítios ativos de enzimas para promover mecanismos de reação extraordinariamente adaptados que dependem dos valores de p$K_a$ perturbados de grupos doadores/aceptores de prótons de resíduos específicos.

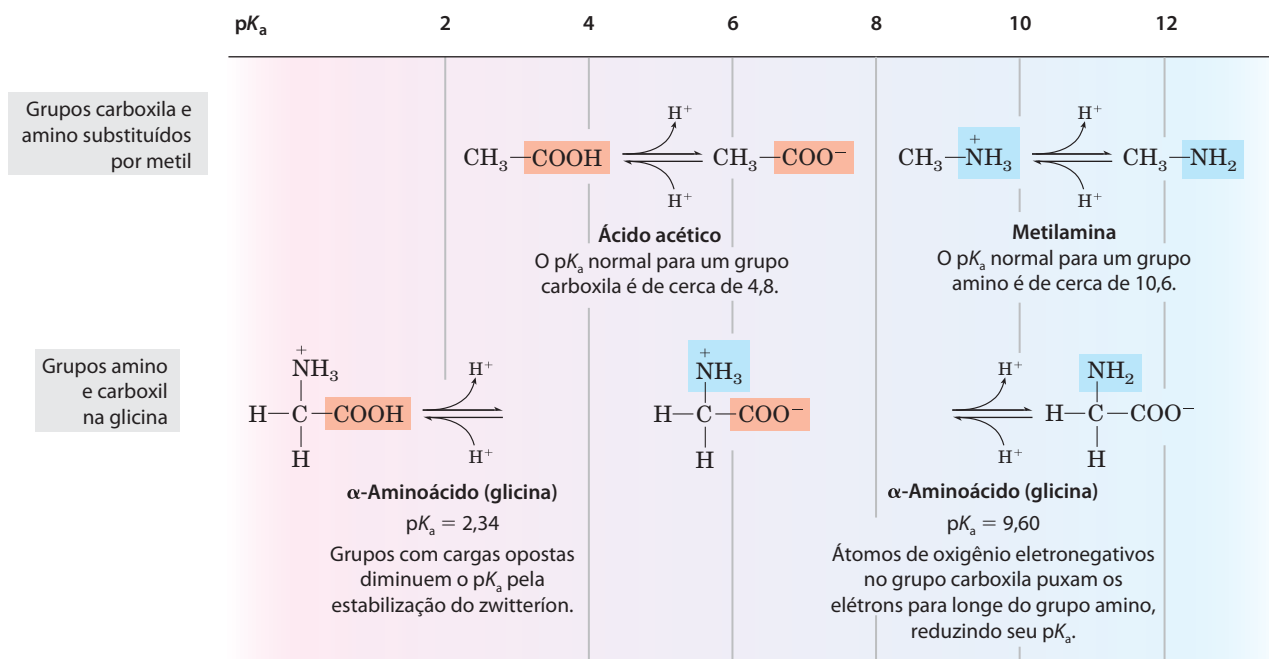



**FIGURA 3-11 Efeito do ambiente químico no p$K_a$.** Os valores de p$K_a$ para os grupos ionizáveis na glicina são mais baixos do que aqueles dos grupos simples de carboxila e o amino substituídos por metil. Essas perturbações do p$K_a$ se devem a interações intramoleculares. Efeitos semelhantes podem ser causados por grupos químicos que possam estar posicionados próximos – por exemplo, no sítio ativo de uma enzima.

A segunda informação fornecida pela curva de titulação da glicina é que esse aminoácido tem duas regiões com poder de tamponamento. Uma delas está na parte relativamente achatada da curva, se estendendo por aproximadamente 1 unidade de pH de cada lado do primeiro p$K_a$ de 2,34, indicando que a glicina é um bom tampão próxima desse pH. A outra zona de tamponamento está centrada em volta do pH 9,60 (observe que a glicina não é um bom tampão no pH do líquido intracelular ou do sangue, em torno de 7,4). Dentro das faixas de tamponamento da glicina, a equação de Henderson-Hasselbalch (p. 64) pode ser utilizada para calcular as proporções de espécies de glicina próton-doadoras e próton-aceptoras necessárias para preparar um tampão em um determinado pH.

## Curvas de titulação predizem a carga elétrica dos aminoácidos

Outra importante peça de informação derivada da curva de titulação de um aminoácido é a relação entre a sua carga final e o pH da solução. No pH de 5,97, o ponto de inflexão entre os dois estágios na sua curva de titulação, a glicina está presente predominantemente em sua forma bipolar, totalmente ionizada, mas sem carga elétrica final (Figura 3-10). O pH característico no qual a carga elétrica final é zero é chamado de **ponto isoelétrico** ou **pH isoelétrico**, designado por **pI**. Para a glicina, que não possui qualquer grupo ionizável em sua cadeia lateral, o ponto isoelétrico é simplesmente a média aritmética dos dois valores de p$K_a$:

$$\text{pI} = \frac{1}{2}(\text{p}K_1 + \text{p}K_2) = \frac{1}{2}(2{,}34 + 9{,}60) = 5{,}97$$

Como evidenciado na Figura 3-10, a glicina tem uma carga final negativa em qualquer pH acima do seu pI e, portanto, irá se deslocar na direção do eletrodo positivo (o ânodo) quando colocada em um campo elétrico. Em qualquer pH abaixo do seu pI, a glicina tem uma carga final positiva e irá se deslocar em direção ao eletrodo negativo (o cátodo). Quanto mais distante for o pH de uma solução de glicina de seu ponto isoelétrico, maior será a carga elétrica final da população de moléculas de glicina. Em um pH igual a 1,0, por exemplo, a glicina existe quase totalmente na forma $^+H_3N—CH_2—COOH$ com uma carga positiva final igual a 1,0. Em um pH de 2,34, onde há uma igual mistura de $^+H_3N—CH_2—COOH$ e $+H_3N—CH_2—COO^-$, a média ou a carga final positiva é igual a 0,5. O sinal e a magnitude da carga final de qualquer aminoácido em qualquer pH podem ser previstos do mesmo modo.

## Aminoácidos diferem em suas propriedades acidobásicas

As propriedades compartilhadas de muitos aminoácidos permitem algumas generalizações simplificadas sobre seu comportamento acidobásico. Em primeiro lugar, todos os aminoácidos com um único grupo $\alpha$-amino, um único grupo $\alpha$-carboxila e um grupo R não ionizável têm curvas de titulação semelhantes à da glicina (Figura 3-10). Esses aminoácidos têm valores de p$K_a$ muito semelhantes, mas não idênticos: p$K_a$ do grupo —COOH na faixa de 1,8 a 2,4, e p$K_a$ do grupo $—NH_3^+$ na faixa de 8,8 a 11,0 (Tabela 3-1).

As diferenças nesses valores de p$K_a$ refletem os ambientes químicos impostos por seus grupos R. Em segundo lugar, os aminoácidos com um grupo R ionizável têm curvas de titulação mais complexas, com *três* estágios correspondendo às três etapas possíveis de ionização; as-

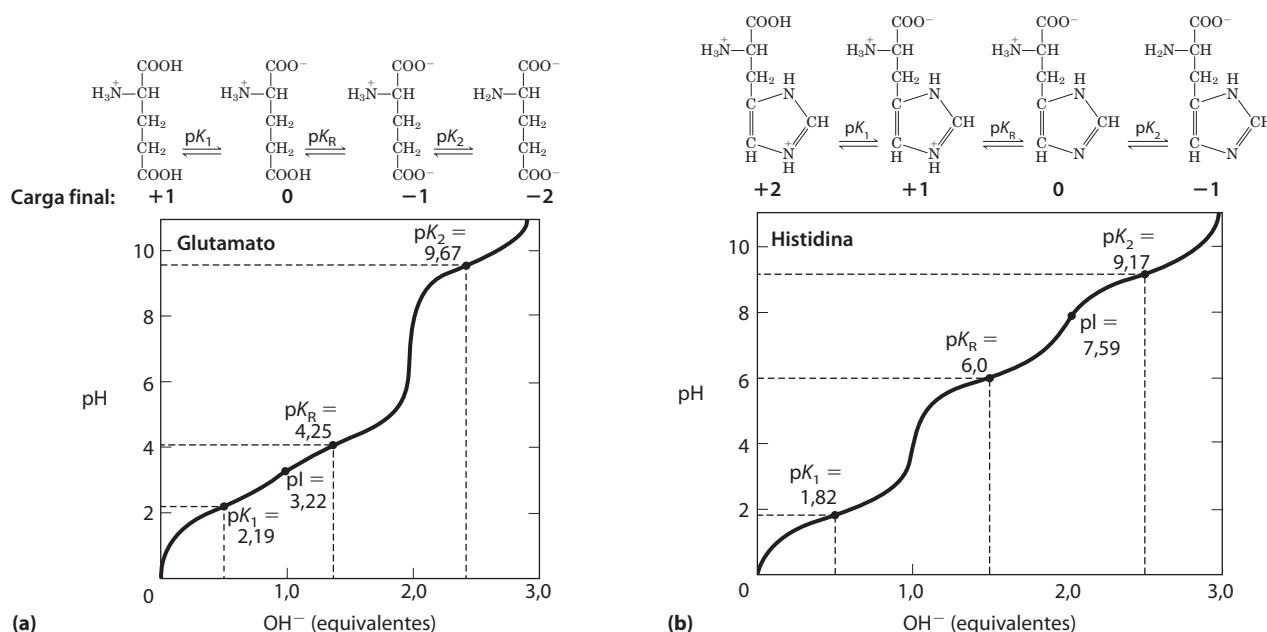



**FIGURA 3-12** Curvas de titulação para **(a)** glutamato e **(b)** histidina. O grupo R do p$K_a$ é designado aqui como p$K_R$.

sim, eles possuem três valores de p$K_a$. O estágio adicional para a titulação do grupo R ionizável se funde, em algum grau, com aquele para a titulação do grupo $\alpha$-carboxila, para a titulação do grupo $\alpha$-amino, ou ambos. As curvas de titulação para dois aminoácidos desse grupo, glutamato e histidina, são mostradas na **Figura 3-12**. Os pontos isoelétricos refletem a natureza dos grupos R ionizáveis presentes. Por exemplo, o glutamato tem um pI de 3,22, consideravelmente mais baixo do que o da glicina. Isso se deve à presença de dois grupos carboxila, que, na média de seus valores de p$K_a$ (3,22), contribuem para uma carga final de –1 que equilibra o +1 proveniente do grupo amina. Do mesmo modo, o pI da histidina, com dois grupos positivamente carregados quando protonados, é de 7,59 (a média dos valores de p$K_a$ dos grupos amina e imidazol), muito mais alto do que aquele da glicina.

Por fim, como apontado anteriormente, sob a condição geral de exposição livre e aberta ao ambiente aquoso, apenas a histidina tem um grupo R (p$K_a$ = 6,0) que fornece um poder de tamponamento significativo próximo do pH neutro normalmente encontrado nos líquidos intracelulares e extracelulares da maior parte dos animais e bactérias (Tabela 3-1).

## RESUMO 3.1 Aminoácidos

- Os 20 aminoácidos comumente encontrados como resíduos em proteínas contêm um grupo $\alpha$-carboxila, um grupo $\alpha$-amino e um grupo R característico substituído no átomo do carbono $\alpha$. O átomo de carbono $\alpha$ de todos os aminoácidos, exceto a glicina, é assimétrico e, portanto, os aminoácidos podem existir em pelo menos duas formas estereoisoméricas. Apenas os estereoisômeros L, com uma configuração relacionada à configuração absoluta da molécula de referência L gliceraldeído, são encontrados em proteínas.
- Outros aminoácidos menos comuns também ocorrem, tanto como constituintes de proteínas (pela modificação de resíduos de aminoácidos comuns após a síntese proteica) quanto como metabólitos livres.
- Os aminoácidos podem ser classificados em cinco tipos com base na polaridade e carga (em pH 7) de seus grupos R.
- Os aminoácidos variam em suas propriedades acidobásicas e têm curvas de titulação características. Aminoácidos monoamino monocarboxílicos (com grupos R não ionizáveis) são ácidos dipróticos ($^+H_3NCH(R)COOH$) em pH baixo e existem em várias formas iônicas diferentes à medida que o pH aumenta. Aminoácidos com grupos R ionizáveis têm espécies iônicas adicionais, dependendo do pH do meio e do p$K_a$ do grupo R.

## 3.2 Peptídeos e proteínas

Agora o foco passa a ser os polímeros de aminoácidos, os **peptídeos** e as **proteínas**. Os polipeptídeos que ocorrem biologicamente variam em tamanho de pequenos a muito grandes, consistindo em dois ou três a milhares de resíduos de aminoácidos ligados. Aqui, serão focalizadas as propriedades químicas fundamentais desses polímeros.

### Peptídeos são cadeias de aminoácidos

Duas moléculas de aminoácidos podem ser ligadas de modo covalente por meio de uma ligação amida substituída, denominada **ligação peptídica**, a fim de produzir um dipeptídeo. Tal ligação é formada pela remoção de elementos de água (desidratação) do grupo $\alpha$-carboxila de um aminoácido e do grupo $\alpha$-amino do outro (**Figura 3-13**). A formação da ligação peptídica é um exemplo de

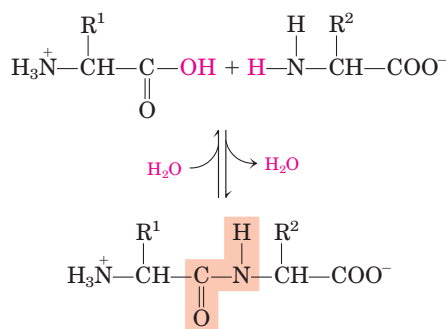



**FIGURA 3-13 Formação de uma ligação peptídica por condensação.** O grupo $\alpha$-amino de um aminoácido (com grupo $R^2$) atua como nucleófilo para deslocar o grupo hidroxila de outro aminoácido (com grupo $R^1$), formando uma ligação peptídica (sombreada). Os grupos amino são bons nucleófilos, mas o grupo hidroxila é um grupo de saída fraco e não prontamente deslocado. No pH fisiológico, a reação mostrada aqui não ocorre em grau apreciável.

uma reação de condensação, uma classe comum de reações nas células vivas. Em condições bioquímicas padrão, o equilíbrio para a reação mostrada na Figura 3-13 favorece os aminoácidos em relação ao dipeptídeo. Para tornar a reação mais favorável termodinamicamente, o grupo carboxila deve ser modificado ou ativado quimicamente, de modo que o grupo hidroxila possa ser mais rapidamente eliminado. Uma abordagem química para esse problema será destacada posteriormente neste capítulo. A abordagem biológica para a formação de ligações peptídicas é o tópico principal do Capítulo 27.

Três aminoácidos podem ser unidos por duas ligações peptídicas para formar um tripeptídeo; do mesmo modo, quatro aminoácidos podem ser unidos para formar um tetrapeptídeo, cinco para formar um pentapeptídeo, e assim por diante. Quando alguns aminoácidos se ligam desse modo, a estrutura é chamada de **oligopeptídeo**. Quando muitos aminoácidos se ligam, o produto é chamado de **polipeptídeo**. As proteínas podem ter milhares de resíduos de aminoácidos. Embora os termos "proteína" e "polipeptídeo" sejam algumas vezes intercambiáveis, as moléculas chamadas de polipeptídeos têm massas moleculares abaixo de 10.000, e as chamadas de proteínas têm massas moleculares mais elevadas.

A **Figura 3-14** mostra a estrutura de um pentapeptídeo. Como já observado, uma unidade de aminoácido em um peptídeo é frequentemente chamada de resíduo (a parte restante após a perda de elementos de água – um átomo de hidrogênio de seu grupo amino e a metade hidroxila de seu grupo carboxila). Em um peptídeo, o resíduo de aminoácido na extremidade com um grupo $\alpha$-amino livre é chamado de resíduo **aminoterminal** (ou *N*-terminal); o resíduo na outra extremidade, que tem um grupo carboxila livre, é o resíduo **carboxiterminal** (*C*-terminal).

**CONVENÇÃO-CHAVE:** Quando uma sequência de aminoácidos de um peptídeo, polipeptídeo ou proteína é exibida, a extremidade aminoterminal é localizada à esquerda e a extremidade carboxiterminal à direita. A sequência é lida da esquerda para a direita, começando com a extremidade aminoterminal. ■

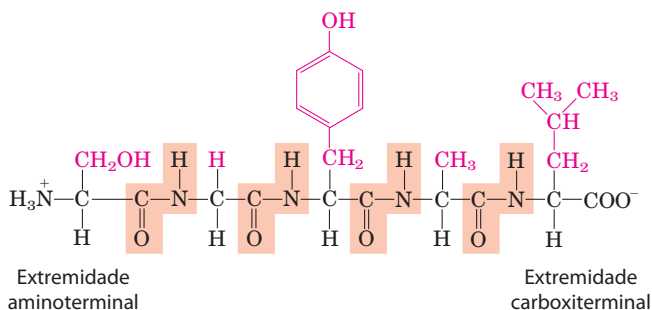



**FIGURA 3-14 O pentapetídeo seril-glicil-tirosil-alanil-leucina, Ser–Gly–Tyr–Ala–Leu, ou SGYAL.** Os peptídeos são nomeados a partir do resíduo aminoterminal, que por convenção é colocado à esquerda. As ligações peptídicas são sombreadas; os grupos R estão em cor-de-rosa.

Embora a hidrólise de uma ligação peptídica seja uma reação exergônica, ela só ocorre lentamente porque tem uma elevada energia de ativação (p. 27). Como resultado, as ligações peptídicas em proteínas são muito estáveis, com meia-vida média ($t_{1/2}$) de cerca de 7 anos na maioria das condições intracelulares.

## Peptídeos podem ser diferenciados por seus comportamentos de ionização

Peptídeos contêm apenas um grupo $\alpha$-amino e um grupo $\alpha$-carboxila livres, em extremidades opostas da cadeia (**Figura 3-15**). Esses grupos se ionizam como nos aminoácidos livres, embora as constantes de ionização sejam diferentes porque um grupo de carga oposta não é mais ligado ao carbono $\alpha$. Os grupos $\alpha$-amino e $\alpha$-carboxila de todos os aminoácidos não terminais são ligados covalentemente nas ligações peptídicas, que não se ionizam e, portanto, não contribuem para o comportamento acidobásico total dos peptídeos. Entretanto, os grupos R de

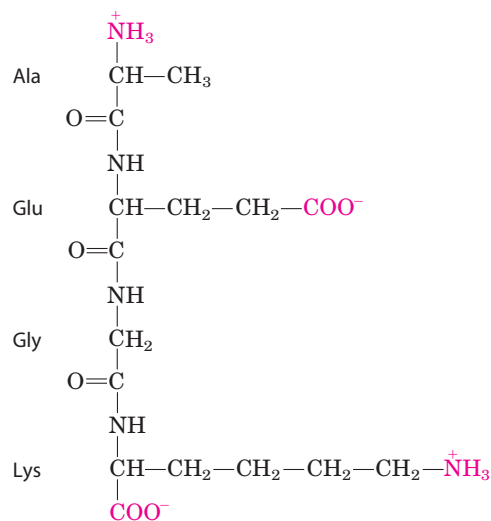



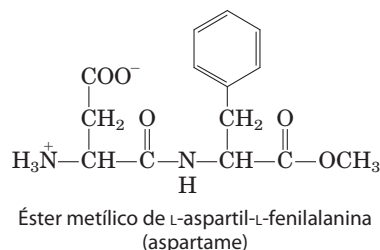
**FIGURA 3-15 Alanil-glutamil-glicil-lisina.** Este tetrapeptídeo tem um grupo $\alpha$-amino livre, um grupo $\alpha$-carboxila livre e dois grupos R ionizáveis. Os grupos ionizados em pH 7,0 estão em cor-de-rosa.

alguns aminoácidos podem se ionizar (Tabela 3-1), e em um peptídeo, esses contribuem para as propriedades acidobásicas gerais da molécula (Figura 3-15). Assim, o comportamento acidobásico de um peptídeo pode ser previsto a partir de seus grupos $\alpha$-amino e $\alpha$-carboxila livres combinado com a natureza e o número de seus grupos R ionizáveis.

Como os aminoácidos livres, os peptídeos têm curvas de titulação características e um pH isoelétrico característico (pI) que não se desloca em um campo isoelétrico. Essas propriedades são exploradas em algumas das técnicas utilizadas para separar peptídeos e proteínas, como será visto mais adiante neste capítulo. Deve ser enfatizado que o valor do p$K_a$ para um grupo R ionizável pode se alterar um pouco quando um aminoácido se torna um resíduo em um peptídeo. A perda da carga nos grupos $\alpha$-carboxila e $\alpha$-amino, as interações com outros grupos R do peptídeo e outros fatores ambientais podem afetar o p$K_a$. Os valores de p$K_a$ para os grupos R listados na Tabela 3-1 podem ser um guia útil para a variação do pH em que um determinado grupo irá se ionizar, mas eles não podem ser estritamente aplicados aos peptídeos.

## Peptídeos e polipeptídeos biologicamente ativos ocorrem em uma ampla variação de tamanhos e composições

Nenhuma generalização pode ser feita sobre as massas moleculares de peptídeos e proteínas biologicamente ativos em relação às suas funções. Peptídeos que ocorrem naturalmente variam em comprimento de dois a muitos milhares de resíduos de aminoácidos. Mesmo os menores peptídeos podem ter efeitos biologicamente importantes. Considere o dipeptídeo sintetizado comercialmente éster metílico de L-aspartil-L-fenilalanina, o adoçante artificial mais conhecido como aspartame ou *NutraSweet*.

Éster metílico de L-aspartil-L-fenilalanina (aspartame)

Muitos peptídeos pequenos exercem seus efeitos em concentrações muito baixas. Por exemplo, vários hormônios de vertebrados (Capítulo 23) são peptídeos pequenos. Esses incluem a ocitocina (nove resíduos de aminoácidos), secretada pela glândula neuro-hipófise, que estimula as contrações uterinas, e o fator de liberação de tireotropina (três resíduos), formado no hipotálamo e que estimula a liberação de outro hormônio, tireotropina, da glândula adeno-hipófise. Alguns venenos extremamente tóxicos de cogumelos, como a amanitina, também são peptídeos pequenos, assim como muitos antibióticos.

Quão longo é o comprimento das cadeias polipeptídicas em proteínas? Como a Tabela 3-2 mostra, os comprimentos variam consideravelmente. O citocromo *c* humano tem 104 resíduos de aminoácidos ligados em uma única cadeia; o quimotripsinogênio bovino tem 245 resíduos. No extremo está a titina, constituinte dos músculos de vertebrados, que tem aproximadamente 27.000 resíduos de aminoácidos e massa molecular de cerca de 3.000.000. A grande maioria das proteínas que ocorrem naturalmente é muito menor do que ela, contendo menos de 2.000 resíduos de aminoácidos.

Algumas proteínas consistem em apenas uma única cadeia polipeptídica, porém outras, chamadas de proteínas **multissubunidade**, têm dois ou mais polipeptídeos associados de modo não covalente (Tabela 3-2). As cadeias polipeptídicas individuais em uma proteína multissubunidade podem ser idênticas ou diferentes. Se pelo menos duas

**TABELA 3-2** Dados moleculares de algumas proteínas

| | Massa molecular | Número de resíduos | Número de cadeias polipeptídicas |
|---|---|---|---|
| Citocromo *c* (humano) | 12.400 | 104 | 1 |
| Ribonuclease A (pâncreas bovino) | 13.700 | 124 | 1 |
| Lisozima (clara de ovo de galinha) | 14.300 | 129 | 1 |
| Mioglobina (coração de equinos) | 16.700 | 153 | 1 |
| Quimotripsina (pâncreas bovino) | 25.200 | 241 | 3 |
| Quimotripsinogênio (bovinos) | 25.700 | 245 | 1 |
| Hemoglobina (humana) | 64.500 | 574 | 4 |
| Albumina sérica (humana) | 66.000 | 609 | 1 |
| Hexocinase (levedura) | 107.900 | 972 | 2 |
| RNA-polimerase (*E. coli*) | 450.000 | 4.158 | 5 |
| Apolipoproteína B (humana) | 513.000 | 4.536 | 1 |
| Glutamina-sintetase (*E. coli*) | 619.000 | 5.628 | 12 |
| Titina (humana) | 2.993.000 | 26.926 | 1 |

são idênticas, a proteína é chamada de **oligomérica**, e as unidades idênticas (consistindo em uma ou mais cadeias polipeptídicas) são chamadas de **protômeros**. A hemoglobina, por exemplo, tem quatro subunidades polipeptídicas: duas cadeias $\alpha$ idênticas e duas cadeias $\beta$ idênticas, todas as quatro mantidas unidas por interações não covalentes. Cada subunidade $\alpha$ é pareada de modo idêntico com uma subunidade $\beta$ dentro da estrutura dessa proteína multissubunidade, de modo que a hemoglobina pode ser considerada tanto um tetrâmero de quatro subunidades de polipeptídeos quanto um dímero de protômeros $\alpha\beta$.

Algumas proteínas contêm duas ou mais cadeias polipeptídicas ligadas covalentemente. Por exemplo, as duas cadeias polipeptídicas da insulina são unidas por ligações dissulfeto. Em tais casos, os polipeptídeos individuais não são considerados subunidades, mas são comumente chamados simplesmente de cadeias.

A composição de aminoácidos das proteínas também é muito variável. Os 20 aminoácidos comuns quase nunca ocorrem em quantidades iguais em uma proteína. Alguns aminoácidos podem ocorrer apenas uma vez ou estar presentes em determinado tipo de proteína; outros podem ocorrer em grande número. A Tabela 3-3 mostra a composição de aminoácidos do citocromo *c* e do quimotripsinogênio bovinos, o último sendo o precursor inativo da enzima digestiva quimotripsina. Essas duas proteínas, com funções muito diferentes, também diferem significativamente em números relativos de cada tipo de resíduo de aminoácido.

É possível calcular o número aproximado de resíduos de aminoácidos em uma simples proteína que não contenha quaisquer outros constituintes químicos dividindo a sua massa molecular por 110. Embora a massa molecular média dos 20 aminoácidos comuns seja de cerca de 138, os aminoácidos menores predominam na maioria das proteínas. Levando em conta as proporções nas quais os vários aminoácidos ocorrem em uma proteína média (Tabela 3-1; as médias são determinadas pela pesquisa da composição dos aminoácidos de mais de 1.000 proteínas diferentes), a massa molecular média dos aminoácidos de uma proteína é mais próxima de 128. Como uma molécula de água ($M_r$ 18) é removida para criar cada ligação peptídica, a massa molecular média de um resíduo de aminoácido em uma proteína é de cerca de 128 – 18 = 110.

**TABELA 3-3** Composição de aminoácidos de duas proteínas

| | Citocromo *c* bovino | | Quimotripsinogênio bovino | |
|---|---|---|---|---|
| **Aminoácido** | **Número de resíduos por molécula** | **Porcentagem do total*** | **Número de resíduos por molécula** | **Porcentagem do total*** |
| Ala | 6 | 6 | 22 | 9 |
| Arg | 2 | 2 | 4 | 1,6 |
| Asn | 5 | 5 | 14 | 5,7 |
| Asp | 3 | 3 | 9 | 3,7 |
| Cys | 2 | 2 | 10 | 4 |
| Gln | 3 | 3 | 10 | 4 |
| Glu | 9 | 9 | 5 | 2 |
| Gly | 14 | 13 | 23 | 9,4 |
| His | 3 | 3 | 2 | 0,8 |
| Ile | 6 | 6 | 10 | 4 |
| Leu | 6 | 6 | 19 | 7,8 |
| Lys | 18 | 17 | 14 | 5,7 |
| Met | 2 | 2 | 2 | 0,8 |
| Phe | 4 | 4 | 6 | 2,4 |
| Pro | 4 | 4 | 9 | 3,7 |
| Ser | 1 | 1 | 28 | 11,4 |
| Thr | 8 | 8 | 23 | 9,4 |
| Trp | 1 | 1 | 8 | 3,3 |
| Tyr | 4 | 4 | 4 | 1,6 |
| Val | 3 | 3 | 23 | 9,4 |
| Total | 104 | 102 | 245 | 99,7 |

**Nota:** Em algumas análises usuais, como a hidrólise ácida, Asp e Asn não são distinguidos um do outro, sendo designados em conjunto como Asx (ou B). De forma semelhante, quando Glu e Gln não podem ser distinguidos, eles são designados juntos como Glx (ou Z). Adicionalmente, Trp é destruído por hidrólise ácida. Métodos adicionais devem ser utilizados para se obter uma avaliação precisa do conteúdo completo de aminoácidos.

*Porcentagens não somam 100% em razão de arredondamentos.

**TABELA 3-4** Proteínas conjugadas

| Classe | Grupo prostético | Exemplo |
|---|---|---|
| Lipoproteínas | Lipídeos | $\beta_1$-Lipoproteína sanguínea |
| Glicoproteínas | Carboidratos | Imunoglobulina G |
| Fosfoproteínas | Grupos fosfato | Caseína do leite |
| Hemoproteínas | Heme (porfirina férrica) | Hemoglobina |
| Flavoproteínas | Nucleotídeos de flavina | Succinato-desidrogenase |
| Metaloproteínas | Ferro<br>Zinco<br>Cálcio<br>Molibdênio<br>Cobre | Ferritina<br>Álcool-desidrogenase<br>Calmodulina<br>Dinitrogenase<br>Plastocianina |

### Algumas proteínas contêm outros grupos químicos além dos aminoácidos

Muitas proteínas, como, por exemplo, as enzimas ribonuclease A e a quimotripsina, contêm apenas resíduos de aminoácidos e nenhum outro constituinte químico; elas são consideradas proteínas simples. Entretanto, algumas proteínas contêm componentes químicos permanentemente associados além dos aminoácidos; elas são chamadas de **proteínas conjugadas**. A parte não aminoácido de uma proteína conjugada é normalmente chamada de **grupo prostético**. As proteínas conjugadas são classificadas com base na natureza química de seus grupos prostéticos (Tabela 3-4); por exemplo, **lipoproteínas** contêm lipídeos**, glicoproteínas** contêm grupos de açúcares e **metaloproteínas** contêm um metal específico. Algumas proteínas contêm mais de um grupo prostético. Normalmente o grupo prostético desempenha um papel importante na função biológica da proteína.

### RESUMO 3.2 Peptídeos e proteínas

- Aminoácidos podem ser unidos de modo covalente por meio de ligações peptídicas para formar peptídeos e proteínas. As células geralmente contêm milhares de proteínas diferentes, cada uma com uma atividade biológica diferente.
- Proteínas podem ser cadeias peptídicas muito longas de 100 a muitos milhares de resíduos de aminoácidos. Entretanto, alguns peptídeos que ocorrem naturalmente possuem apenas alguns poucos resíduos de aminoácidos. Algumas proteínas são compostas por várias cadeias polipeptídicas associadas de modo não covalente, chamadas de subunidades.
- Proteínas simples produzem, por hidrólise, apenas aminoácidos; proteínas conjugadas contêm além deles, alguns outros componentes, tais como um metal ou um grupo prostético.

## 3.3 Trabalhando com proteínas

A compreensão da estrutura e função de proteínas pelos bioquímicos derivou de estudos de muitas proteínas individuais. Para estudar em detalhe uma proteína, o pesquisador deve ser capaz de separá-la de outras proteínas na forma pura e deve dominar as técnicas para determinar suas propriedades. Os métodos necessários vêm da química de proteínas, disciplina tão antiga quanto a própria bioquímica e que mantém uma posição central na pesquisa bioquímica.

### Proteínas podem ser separadas e purificadas

Uma preparação pura é essencial para a determinação das propriedades e atividades de uma proteína. Visto que as células contêm milhares de diferentes tipos de proteínas, como uma proteína pode ser purificada? Métodos clássicos para separação de proteínas se aproveitam das propriedades que variam de uma proteína para outra, incluindo o tamanho, a carga e as propriedades de ligação. Eles foram complementados nas últimas décadas por outros métodos, envolvendo a clonagem do DNA e o sequenciamento do genoma, que podem simplificar o processo de purificação de proteínas. Os métodos mais recentes, apresentados no Capítulo 9, frequentemente modificam artificialmente a proteína que está sendo purificada, adicionando poucos ou muitos resíduos de aminoácidos a uma ou ambas as extremidades. A conveniência, portanto, paga o preço de alterar potencialmente a atividade da proteína purificada. A purificação de proteínas em seus estados nativos (a forma como funcionam nas células) depende geralmente dos métodos descritos aqui.

A fonte de uma proteína é geralmente um tecido ou uma célula microbiana. A primeira etapa de qualquer procedimento de purificação de proteína é romper essas células, liberando suas proteínas em uma solução chamada de **extrato bruto**. Se necessário, pode ser utilizada centrifugação diferencial para preparar frações subcelulares ou para isolar organelas específicas (ver Figura 1-8).

Uma vez prontos o extrato ou a preparação de organelas, vários métodos estão disponíveis para purificar uma ou mais das proteínas neles contidas. Em geral, o extrato é submetido a tratamentos para separar as proteínas em diferentes **frações** com base em uma propriedade, tal como tamanho ou carga, em um processo chamado de **fracionamento**. Etapas iniciais de fracionamento em uma purificação utilizam diferenças na solubilidade de proteínas, que são uma função complexa do pH, temperatura, concentra-

ção de sais e outros fatores. A solubilidade de proteínas é reduzida em presença de alguns sais, um efeito chamado de *salting out*. A adição de certos sais na quantidade correta pode precipitar seletivamente algumas proteínas, enquanto outras permanecem em solução. Particularmente eficaz, o sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$) é muitas vezes utilizado para precipitar proteínas. As proteínas assim precipitadas são removidas daquelas que permanecem em solução por centrifugação em baixa rotação.

Uma solução contendo a proteína de interesse geralmente precisa ser modificada adicionalmente antes que as etapas de purificação subsequentes sejam possíveis. Por exemplo, a **diálise** é um procedimento que separa proteínas de solutos pequenos se aproveitando do tamanho maior das proteínas. O extrato parcialmente purificado é colocado em uma bolsa ou tubo composto por uma membrana semipermeável. Quando este é suspenso em um volume muito maior de uma solução tamponada de força iônica adequada, a membrana permite a troca de sal e de solução tampão, mas não de proteínas. Assim, a diálise retém as proteínas grandes no interior da bolsa membranosa ou tubo, permitindo que a concentração de outros solutos na preparação de proteínas se altere até ficarem em equilíbrio com a solução fora da membrana. A diálise pode ser utilizada, por exemplo, para remover o sulfato de amônio da preparação proteica.

Os métodos mais eficientes para fracionar proteínas utilizam a **cromatografia em coluna**, que se utiliza das diferenças na carga das proteínas, tamanho, afinidade de ligação e outras propriedades (**Figura 3-16**). Um material sólido poroso com propriedades químicas adequadas (fase estacionária) é mantido em uma coluna, e uma solução tamponada (fase móvel) migra através dela. A proteína, dissolvida na mesma solução tampão que foi utilizada para estabelecer a fase móvel, é colocada no topo da coluna. A proteína então atravessa a matriz sólida como uma banda que se expande cada vez mais no interior da fase móvel maior. Proteínas individuais migram com mais rapidez ou lentidão através da coluna, dependendo de suas propriedades.

A **cromatografia de troca iônica** explora as diferenças no sinal e magnitude da carga elétrica final de proteínas em um determinado pH (**Figura 3-17a**). A matriz da coluna é um polímero sintético (resina) que contém grupos carregados ligados; aqueles ligados a grupos aniônicos são chamados de **permutadores de cátions**, e aqueles ligados a grupos catiônicos são chamados de **permutadores de ânions**. A afinidade de cada proteína pelos grupos carregados na coluna é afetada pelo pH (que determina o estado de ionização da molécula) e a concentração de íons de sais livres competindo na solução circundante. A separação pode ser otimizada por mudanças graduais no pH e/ou na concentração de sal da fase móvel de modo a criar um gradiente de pH ou de sal. Na **cromatografia de troca catiônica**, a matriz sólida tem grupos carregados negativamente. Na fase móvel, as proteínas com uma carga final positiva migram através da matriz mais lentamente que aquelas proteínas com uma carga final negativa, porque a migração das primeiras é mais retardada por sua interação com a fase estacionária.

Em colunas de troca iônica, a expansão da banda de proteína na fase móvel (a solução proteica) é causada

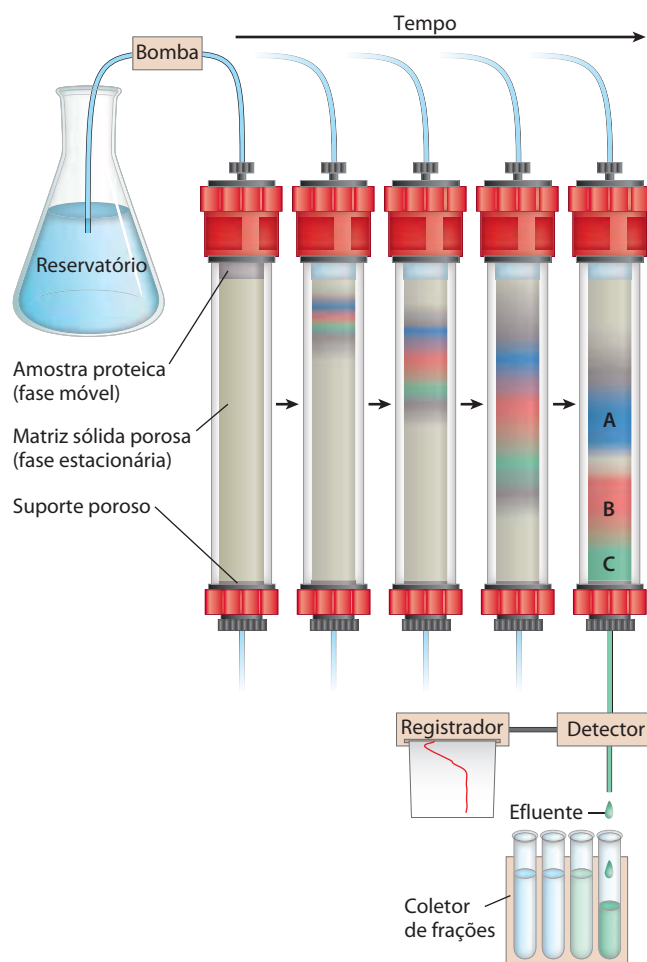



**FIGURA 3-16 Cromatografia em coluna.** Os elementos padrão de uma coluna cromatográfica incluem um material poroso (matriz) sólido apoiado no interior de uma coluna, geralmente feita de plástico ou vidro. Uma solução, a fase móvel, flui através da matriz, a fase estacionária. A solução que sai da coluna (o efluente) é constantemente substituída pela solução fornecida por um reservatório no topo. A solução de proteína a ser separada é colocada no topo da coluna e deixada percolar pela matriz sólida. Mais solução é adicionada no topo. A solução proteica forma uma banda no interior da fase móvel que tem inicialmente a profundidade da solução de proteína aplicada à coluna. À medida que as proteínas migram através da coluna (mostrada aqui em cinco momentos diferentes), elas são retardadas em diferentes graus por suas diferentes interações com o material da matriz. A banda total de proteína, portanto, se amplia à medida que se move através da coluna. Tipos individuais de proteínas (como A, B e C, mostradas em azul, vermelho e verde) se separam gradualmente umas das outras, formando bandas no interior da banda proteica mais larga. A separação melhora (i.e., aumenta a resolução) à medida que o comprimento da coluna aumenta. Entretanto, cada banda proteica individual também se alarga com o tempo devido à dispersão por difusão, processo que diminui a resolução. Nesse exemplo, a proteína A está bem separada da B e C, mas a dispersão por difusão impede a separação completa de B e C sob essas condições.

tanto pela separação de proteínas com diferentes propriedades quanto pela dispersão por difusão. À medida que o comprimento da coluna aumenta, a resolução de dois tipos de proteínas com diferentes cargas finais geralmente melhora. Entretanto, a velocidade na qual a solução proteica pode fluir através da coluna geralmente diminui com o comprimento da coluna. E, à medida que a duração do

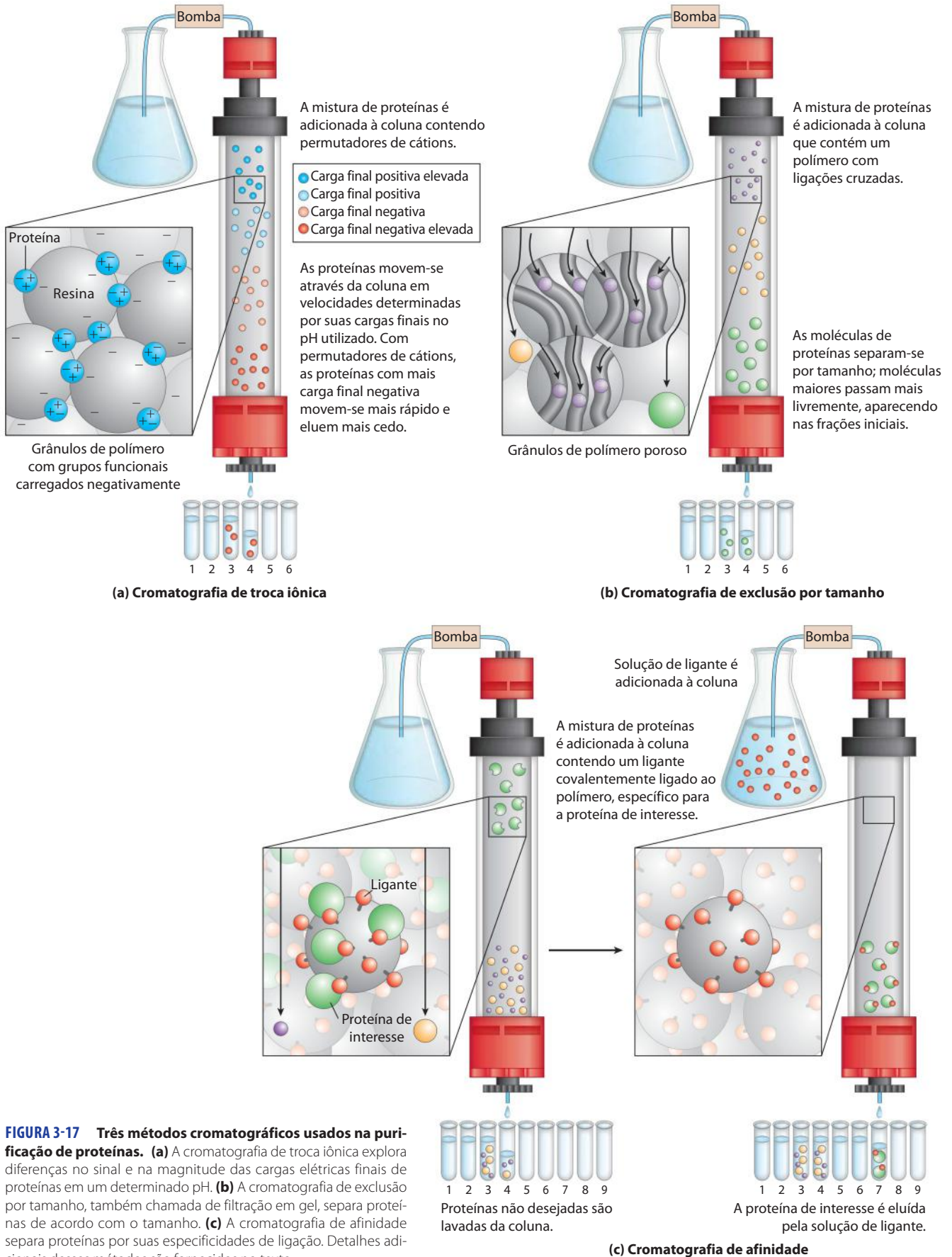



**FIGURA 3-17 Três métodos cromatográficos usados na purificação de proteínas.** **(a)** A cromatografia de troca iônica explora diferenças no sinal e na magnitude das cargas elétricas finais de proteínas em um determinado pH. **(b)** A cromatografia de exclusão por tamanho, também chamada de filtração em gel, separa proteínas de acordo com o tamanho. **(c)** A cromatografia de afinidade separa proteínas por suas especificidades de ligação. Detalhes adicionais desses métodos são fornecidos no texto.

tempo dispendido na coluna aumenta, a resolução pode diminuir como resultado da dispersão por difusão no interior de cada banda proteica. À medida que o conteúdo da solução proteica sai de uma coluna, porções sucessivas (frações) desse efluente são coletadas em tubos de ensaio. Cada fração pode ser testada para a presença da proteína de interesse, assim como outras propriedades, tais como a força iônica ou a concentração total de proteínas. Todas as frações positivas para a proteína de interesse podem ser reunidas como o produto dessa etapa cromatográfica da purificação de proteínas.

**PROBLEMA RESOLVIDO 3-1** **Troca iônica de peptídeos**

Um bioquímico deseja separar dois peptídeos por cromatografia por troca iônica. No pH da fase móvel a ser utilizado na coluna, um peptídeo(A) possui uma carga final de –3, em decorrência da presença de mais resíduos de Glu e Asp do que de Arg, Lys e His. O peptídeo B tem carga final de +1. Qual peptídeo irá eluir primeiro a partir de uma resina de troca catiônica? Qual irá eluir primeiro a partir da resina de troca aniônica?

**Solução:** Uma resina de troca catiônica possui cargas negativas e se liga a moléculas carregadas positivamente, retardando seu progresso pela coluna. O peptídeo B, com sua carga final positiva, interagirá mais fortemente do que o peptídeo A com a resina de troca catiônica e, portanto, o peptídeo A irá eluir primeiro. Na resina de troca aniônica, o peptídeo B irá eluir primeiro. O peptídeo A, sendo carregado negativamente, será retardado por sua interação com a resina positivamente carregada.

A Figura 3-17 mostra duas outras variações da cromatografia em coluna além da troca iônica. A **cromatografia de exclusão por tamanho**, também chamada de filtração em gel (Figura 3-17b), separa as proteínas de acordo com o tamanho. Neste método, as proteínas grandes emergem da coluna mais cedo do que as proteínas menores – resultado um tanto contrário ao esperado intuitivamente. A fase sólida consiste em grânulos de polímeros reticulados com poros ou cavidades projetados com um determinado tamanho. As proteínas grandes não podem entrar nas cavidades e, assim, tomam um caminho mais curto (e mais rápido) através da coluna, ao redor dos grânulos. Proteínas pequenas penetram nas cavidades e são retardadas em seu caminho de labirintos através da coluna. A cromatografia de exclusão por tamanho também pode ser utilizada para estimar o tamanho de uma proteína que está sendo purificada, utilizando métodos semelhantes aos descritos na Figura 3-19.

A **cromatografia de afinidade** se baseia na afinidade de ligação (Figura 3-17c). Os grânulos na coluna têm um grupo químico covalentemente ligado chamado de ligante – um grupo ou molécula que se liga a uma macromolécula, tal como uma proteína. Quando uma mistura de proteínas é adicionada à coluna, qualquer proteína com afinidade para esse ligante se liga aos grânulos, e sua migração através da matriz é retardada. Por exemplo, se a função biológica de uma proteína envolve a ligação ao ATP, então, ligando-se uma molécula que se assemelha ao ATP a esses grânulos na coluna cria-se uma matriz de afinidade que pode ajudar a purificar a proteína. À medida que a solução proteica se desloca através da coluna, as proteínas ligadoras de ATP (incluindo a proteína de interesse) se ligam à matriz. Após a lavagem das proteínas que não se ligam na coluna, a proteína ligada é eluída por uma solução contendo uma alta concentração de sal ou um ligante livre – nesse caso o ATP ou um análogo do ATP. O sal enfraquece a ligação da proteína ao ligante imobilizado, interferindo com as interações iônicas. O ligante livre compete com o ligante ligado aos grânulos, liberando a proteína da matriz; o produto proteico que elui da coluna é com frequência ligado ao ligante utilizado para eluí-lo.

Métodos cromatográficos são aperfeiçoados com a utilização de **HPLC**, ou **cromatografia líquida de alto desempenho**. A HPLC faz uso de bombas de alta pressão que aceleram o movimento das moléculas de proteína coluna abaixo, bem como materiais cromatográficos de maior qualidade que podem suportar a força de esmagamento do fluxo pressurizado. Reduzindo o tempo de trânsito na coluna, a HPLC pode limitar a dispersão por difusão das bandas proteicas e, assim, melhorar muito a resolução.

A abordagem para purificação de uma proteína que não tenha sido previamente isolada é guiada tanto pelos precedentes estabelecidos quanto pelo senso comum. Na maioria dos casos, vários métodos diferentes devem ser utilizados sequencialmente para purificar uma proteína completamente, cada método separando as proteínas com base em propriedades diferentes. Por exemplo, se uma etapa separa as proteínas ligadoras de ATP daquelas que não se ligam a ele, então, a próxima etapa deve separar as várias proteínas ligadoras de ATP com base no tamanho ou na carga para isolar a proteína específica que é desejada. A escolha dos métodos é um tanto empírica, e muitas estratégias podem ser tentadas antes que a mais eficaz seja encontrada. Tentativas e erros podem ser frequentemente minimizados baseando-se o novo procedimento em técnicas de purificação desenvolvidas para proteínas semelhantes. Protocolos de purificação publicados estão disponíveis para muitos milhares de proteínas. O senso comum determina que procedimentos mais baratos, tal como o *salting out*, devam ser utilizados primeiro, quando o volume total e o número de contaminantes são maiores. Métodos cromatográficos são frequentemente impraticáveis nas fases iniciais porque a quantidade de meio cromatográfico necessário aumenta com o tamanho da amostra. À medida que cada etapa de purificação se completa, o tamanho da amostra geralmente se torna menor (Tabela 3-5), tornando possível utilizar procedimentos cromatográficos mais sofisticados (e caros) em fases posteriores.

## Proteínas podem ser separadas e caracterizadas por eletroforese

Outra técnica importante para separação de proteínas se baseia na migração de proteínas carregadas em um campo elétrico, um processo chamado de **eletroforese**. Em geral, esses procedimentos não são utilizados para purificar proteínas, pois alternativas mais simples estão disponíveis e métodos eletroforéticos com frequência afetam adversa-

**TABELA 3-5** Tabela de purificação para uma enzima hipotética

| Procedimento ou etapa | Volume da fração (mL) | Proteína total (mg) | Atividade (unidades) | Atividade específica (unidades/mg) |
|---|---|---|---|---|
| 1. Extrato celular bruto | 1.400 | 10.000 | 100.000 | 10 |
| 2. Precipitação com sulfato de amônio | 280 | 3.000 | 96.000 | 32 |
| 3. Cromatografia de troca iônica | 90 | 400 | 80.000 | 200 |
| 4. Cromatografia de exclusão por tamanho | 80 | 100 | 60.000 | 600 |
| 5. Cromatografia de afinidade | 6 | 3 | 45.000 | 15.000 |

**Nota**: Todos os dados representam o estado da amostra após a realização do procedimento designado. A atividade e a atividade específica são definidas na página 95.

mente a estrutura e, desse modo, a função das proteínas. Entretanto, como um método analítico, a eletroforese é extremamente importante. Sua vantagem é que as proteínas podem ser visualizadas, bem como separadas, permitindo ao pesquisador estimar rapidamente o número de proteínas diferentes em uma mistura ou o grau de pureza de uma preparação proteica específica. A eletroforese também pode ser utilizada para determinar propriedades cruciais de uma proteína, tal como seu ponto isoelétrico, e estimar sua massa molecular.

Em geral, a eletroforese de proteínas é realizada em géis compostos de polímeros reticulados de poliacrilamida (**Figura 3-18**). O gel de poliacrilamida age como uma peneira molecular, retardando a migração de proteínas aproximadamente em proporção à sua razão carga-massa. A migração também pode ser afetada pela forma da proteína. Na eletroforese, a força que move a macromolécula é o potencial elétrico *E*. A mobilidade eletroforética, $\mu$, de uma molécula é a razão de sua velocidade *V*, em relação ao seu potencial elétrico. A mobilidade eletroforética é também igual à carga

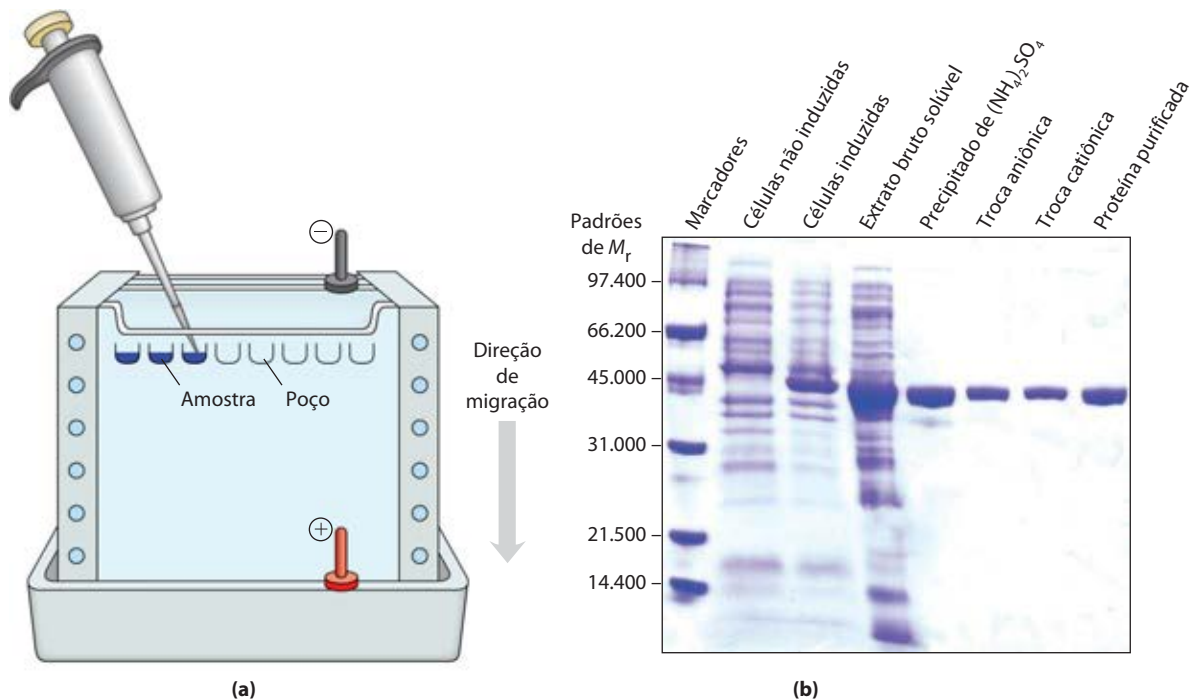



**FIGURA 3-18 Eletroforese. (a)** Diferentes amostras são colocadas em poços ou depressões no topo do gel de SDS-poliacrilamida. As proteínas se movem para o gel quando um campo elétrico é aplicado. O gel minimiza as correntes de convecção causadas pelos pequenos gradientes de temperatura, bem como movimentos proteicos além daqueles induzidos pelo campo elétrico. **(b)** Proteínas podem ser visualizadas após eletroforese tratando o gel com um corante como o azul Coomassie, que se liga às proteínas, mas não ao gel em si. Cada banda no gel representa uma proteína diferente (ou subunidade de proteína); proteínas menores se movem através do gel mais rapidamente que as maiores e, portanto, são encontradas mais próximas da base do gel. Esse gel ilustra a purificação da proteína RecA de *Escherichia coli* (descrita no Capítulo 25). O gene para a proteína RecA foi clonado (Capítulo 9) para que sua expressão (síntese da proteína) pudesse ser controlada. A primeira canaleta mostra um conjunto de proteínas padrão (de $M_r$ conhecido), servindo como marcadores de massa molecular. As duas canaletas seguintes mostram proteínas de células de *E. coli* antes e depois que a síntese da proteína RecA foi induzida. A quarta canaleta mostra as proteínas presentes após sucessivas etapas de purificação. A proteína purificada é uma cadeia polipeptídica única ($M_r$ 38.000), como mostrado na canaleta mais à direita.

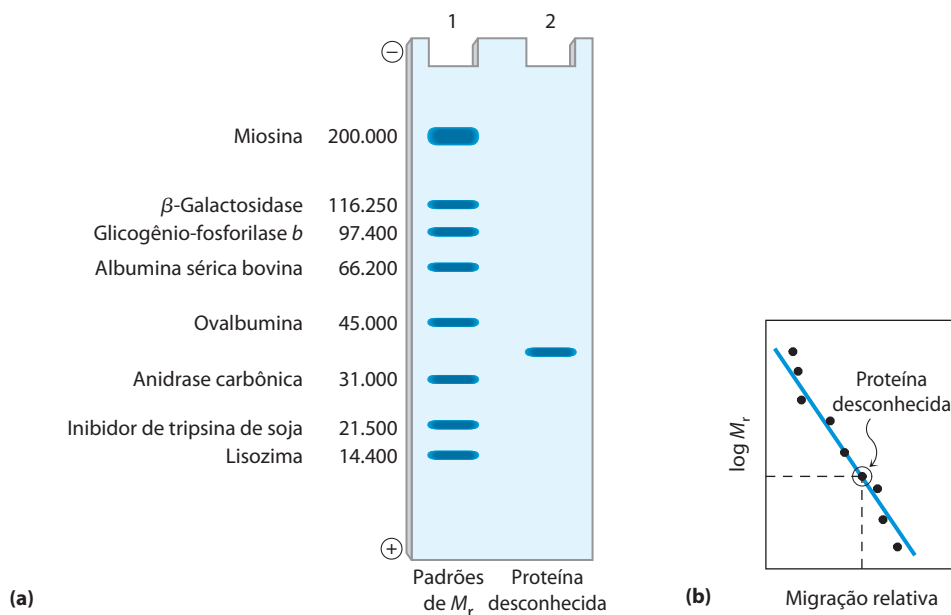



**FIGURA 3-19 Estimando a massa molecular de uma proteína.** A mobilidade eletroforética de uma proteína em gel de SDS-poliacrilamida está relacionada à sua massa molecular, $M_r$. **(a)** Proteínas-padrão de massa molecular conhecido são sujeitas à eletroforese (calha 1). Estas proteínas marcadoras podem ser usadas para estimar a massa molecular de uma proteína desconhecida (calha 2). **(b)** Um gráfico do log $M_r$ das proteínas marcadoras *versus* migração relativa durante a eletroforese é linear, permitindo que a massa molecular da proteína desconhecida seja lido a partir do gráfico. (De maneira semelhante, um conjunto de proteínas padrão com tempos de retenção reproduzíveis em uma coluna de exclusão por tamanho pode ser usado para criar uma curva padrão de tempo de retenção *versus* log $M_r$. O tempo de retenção de uma substância desconhecida na coluna pode ser comparado com sua curva padrão para obter um $M_r$ aproximado.)

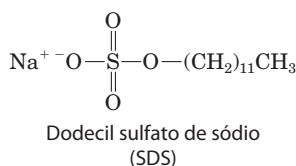
final $Z$ da molécula dividida por seu coeficiente de fricção $f$, que reflete em parte a forma de uma proteína. Portanto:

$$\mu = \frac{V}{E} = \frac{Z}{f}$$

A migração de uma proteína em um gel durante a eletroforese é, portanto, uma função do seu tamanho e formato.

Um método eletroforético comumente empregado para estimar a pureza e a massa molecular utiliza o detergente **dodecil sulfato de sódio** (**SDS**) ("dodecil" significa uma cadeia de 12 carbonos).

$$\mathrm{Na^{+}\ {}^{-}O{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{\underset{\underset{\displaystyle O}{\|}}{S}}{-}O{-}(CH_2)_{11}CH_3}$$

Dodecil sulfato de sódio (SDS)

Uma proteína se ligará cerca de 1,4 vez sua massa de SDS, aproximadamente uma molécula de SDS para cada resíduo de aminoácido. Um SDS ligado contribui com uma grande carga final negativa, tornando a carga intrínseca da proteína insignificante e conferindo a cada proteína uma razão carga-massa semelhante. Além disso, a ligação de SDS desdobra parcialmente as proteínas, de modo que a maior parte das proteínas ligadas ao SDS assume uma forma semelhante a bastonetes. A eletroforese na presença de SDS, portanto, separa proteínas quase que exclusivamente com base em sua massa (massa molecular), com os peptídeos menores migrando mais rapidamente. Após a eletroforese, as proteínas são visualizadas pela adição de um corante, como o azul de Coomassie, que se liga às proteínas, mas não ao gel em si (Figura 3-18b). Assim, um pesquisador pode monitorar o progresso de um procedimento de purificação de proteínas à medida que o número de bandas de proteínas visíveis no gel diminui após cada nova fase de fracionamento. Quando comparada às posições para as quais as proteínas de massa molecular conhecido migram no gel, a posição de uma proteína não identificada pode fornecer uma boa estimativa de sua massa molecular (**Figura 3-19**). Se a proteína tem duas ou mais subunidades diferentes, as subunidades são geralmente separadas por tratamento com SDS, e uma banda separada aparece para cada uma delas. **Eletroforese em gel com SDS**

A **focalização isoelétrica** é um procedimento utilizado para determinar o ponto isoelétrico (pI) de uma proteína (**Figura 3-20**). Um gradiente de pH é estabelecido permitindo-se que uma mistura de ácidos e bases orgânicas de baixo peso molecular (anfólitos; p. 81) se distribuía em um campo elétrico gerado ao longo do gel. Quando uma mistura de proteínas é aplicada, cada proteína migra até alcançar o pH correspondente ao seu pI. Proteínas com pontos isoelétricos diferentes são, assim, distribuídas de modo diferente ao longo do gel.

A combinação da focalização isoelétrica com a eletroforese em SDS sequencialmente em um processo chamado de **eletroforese bidimensional** permite a resolução de misturas complexas de proteínas (**Figura 3-21**). Esse é um método analítico mais sensível do que qualquer método eletroforético sozinho. A eletroforese bidimensional separa proteínas de massa molecular idêntica que diferem em seu pI, ou proteínas com valores de pl semelhantes, mas com massas moleculares diferentes.

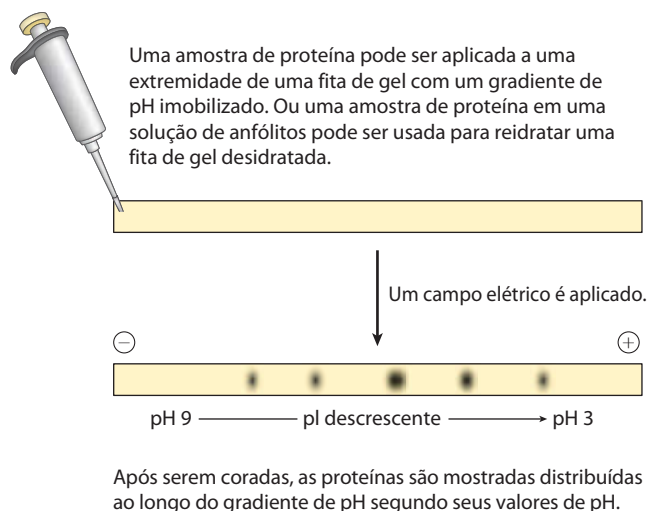



**FIGURA 3-20** **Focalização isoelétrica.** Essa técnica separa proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos. Uma mistura de proteínas é colocada em uma fita de gel contendo um gradiente de pH imobilizado. Com a aplicação de um campo elétrico, as proteínas entram no gel e migram até que cada uma atinja um pH equivalente ao seu pI. Lembre-se que quando o pH = pI, a carga final de uma proteína é zero.

## Proteínas não separadas podem ser quantificadas

Para purificar uma proteína, é essencial possuir um meio para detectar e quantificar aquela proteína na presença de muitas outras proteínas em cada estágio do procedimento. Frequentemente, a purificação deve prosseguir na ausência de qualquer informação sobre o tamanho ou propriedades físicas da proteína ou sobre a fração da massa proteica total que ela representa no extrato. Para proteínas que são enzimas, a quantidade de uma determinada solução ou extrato de tecido pode ser medida ou ensaiada, em termos do efeito catalítico que a enzima produz – isto é, o *aumento* na taxa em que seu substrato é convertido para produtos de reação quando a enzima está presente. Para esse propósito, o pesquisador deve conhecer (1) a equação geral da reação catalisada, (2) um procedimento analítico para determinar o desaparecimento do substrato ou o aparecimento de um produto de reação, (3) se a enzima necessita de cofatores, como íons metálicos ou coenzimas, (4) a dependência da atividade enzimática da concentração do substrato, (5) o pH ótimo e (6) uma zona de temperatura em que a enzima é estável e possui alta atividade. Enzimas são geralmente analisadas em seu pH ótimo em alguma temperatura conveniente na faixa de 25 a 38°C. Altas concentrações de substrato também são geralmente utilizadas, de modo que a velocidade de reação inicial, medida experimentalmente, é proporcional à concentração da enzima (Capítulo 6).

Por convenção internacional, a unidade 1,0 de atividade enzimática para a maior parte das enzimas é definida como a quantidade de enzima que leva à transformação de 1,0 $\mu$mol de substrato em produto, por minuto, a 25°C, sob condições ótimas de medição (para algumas enzimas, essa definição não é conveniente, e uma unidade pode ser definida diferentemente). O termo **atividade** se refere às unidades totais de enzima em uma solução. A **atividade específica** é o número de unidades de enzimas por miligrama de proteína total (**Figura 3-22**). A atividade específica é uma medida de pureza enzimática: ela aumenta durante a purificação de uma enzima e se torna máxima e constante quando a enzima é pura (Tabela 3-5, p. 93).

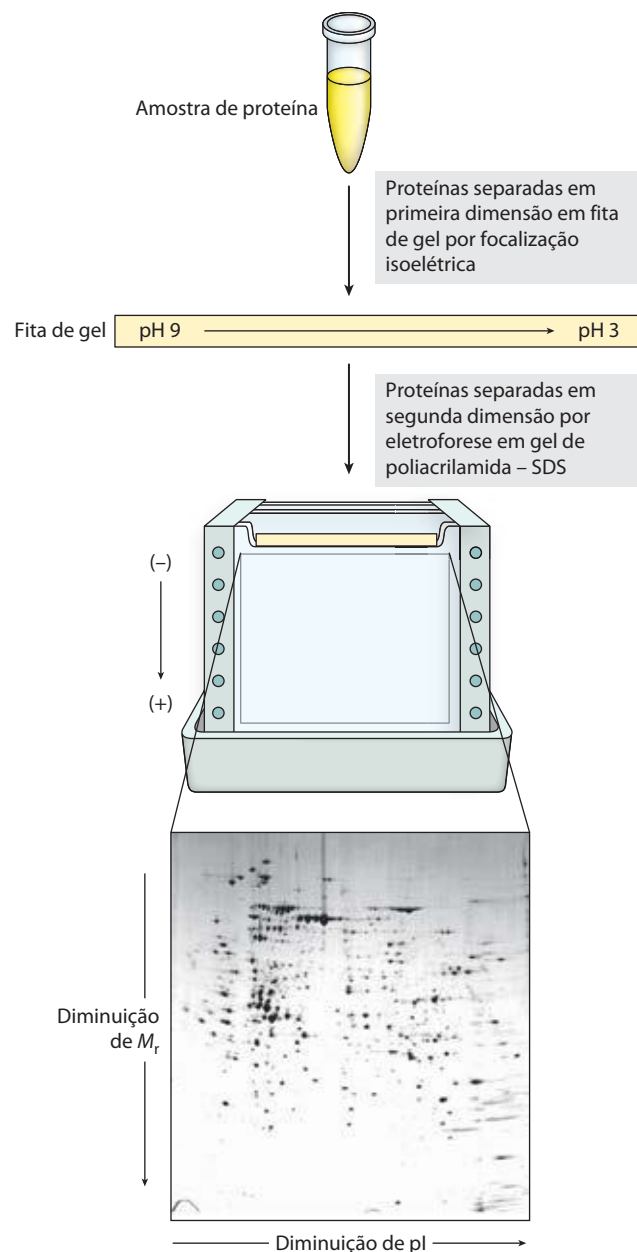



**FIGURA 3-21** **Eletroforese bidimensional.** Em primeiro lugar, as proteínas são separadas por focalização isoelétrica em uma fita de gel fina. O gel é colocado então horizontalmente em um segundo gel em forma de placa, e as proteínas são separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. A separação horizontal reflete diferenças no pI; a separação vertical reflete diferenças na massa molecular. O complemento proteico original é, deste modo, espalhado em duas dimensões. Milhares de proteínas celulares podem ser resolvidas usando essa técnica. Manchas de proteínas individuais podem ser cortadas do gel e identificadas por espectrometria de massa (ver Figuras 3-30 e 3-31).

Após cada etapa de purificação, a atividade da preparação (em unidades de atividade enzimática) é analisada, a quantidade total de proteína é determinada independente-

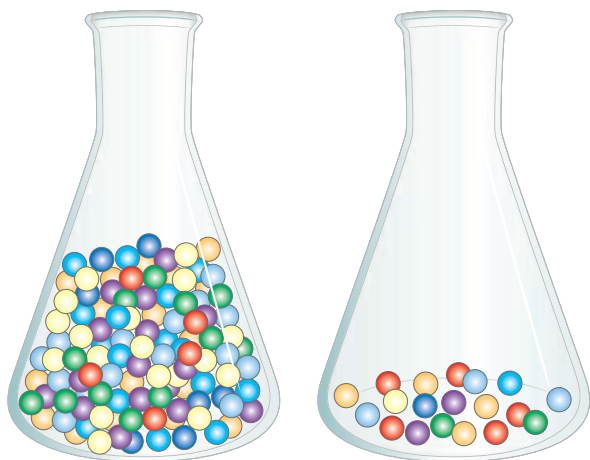



**FIGURA 3-22 Atividade *versus* atividade específica.** A diferença entre esses termos pode ser ilustrada considerando dois béqueres contendo esferas. Os béqueres contêm o mesmo número de esferas vermelhas, mas números diferentes de esferas de outras cores. Se as esferas representam proteínas, ambos os béqueres contêm a mesma *atividade* da proteína representada pelas esferas vermelhas. O segundo béquer, no entanto, apresenta a *atividade específica* maior porque as esferas vermelhas representam uma fração mais alta do total.

mente e a razão das duas fornece a atividade específica. A atividade e a proteína total geralmente diminuem em cada etapa. A atividade diminui porque há sempre alguma perda em consequência da inativação ou interações não ideais com materiais cromatográficos ou outras moléculas na solução. A proteína total diminui porque o objetivo é remover o máximo possível de proteína inespecífica e indesejada. Em uma etapa bem-sucedida, a perda de proteína inespecífica é muito maior que a perda de atividade; portanto, a atividade específica aumenta mesmo que a atividade total decaia. Os dados estão reunidos em uma tabela de purificação semelhante à Tabela 3-5. Em geral, uma proteína é considerada pura quando etapas de purificação adicionais não conseguem aumentar a atividade específica e quando apenas uma única espécie de proteína pode ser detectada (p. ex., por eletroforese).

Para proteínas não enzimas, outros métodos de quantificação são necessários. Proteínas de transporte podem ser analisadas pela sua ligação à molécula que elas transportam e hormônios e toxinas pelo efeito biológico que produzem; por exemplo, hormônios de crescimento irão estimular o crescimento de certas células em cultura. Algumas proteínas estruturais representam uma grande fração de uma massa tecidual a ponto de ela ser rapidamente extraída e purificada sem um ensaio funcional. As abordagens são tão variadas quanto as próprias proteínas.

### RESUMO 3.3 Trabalhando com proteínas

- Proteínas são separadas e purificadas com base nas diferenças de suas propriedades. Proteínas podem ser seletivamente precipitadas por mudanças no pH ou temperatura e, particularmente, pela adição de certos sais. Uma ampla gama de procedimentos cromatográficos faz uso de diferenças de tamanho, afinidades de ligação, carga e outras propriedades. Essas incluem a troca iônica, a exclusão por tamanho, a afinidade e a cromatografia líquida de alto desempenho.
- Eletroforese separa proteínas com base na massa ou carga. A eletroforese em gel SDS e a focalização isoelétrica podem ser utilizadas separadamente ou em combinação para uma resolução mais alta.
- Todos os procedimentos de purificação exigem um método para quantificação ou análise da proteína de interesse na presença de outras proteínas. A purificação pode ser monitorada por análise da atividade específica.

## 3.4 A estrutura de proteínas: estrutura primária

A purificação de uma proteína é geralmente apenas um prelúdio para uma dissecção bioquímica detalhada de sua estrutura e função. O que torna uma proteína uma enzima, outra um hormônio, outra uma proteína estrutural e ainda outra um anticorpo? Como elas diferem quimicamente? As distinções mais óbvias são estruturais, e agora será abordada a estrutura das proteínas.

A estrutura de grandes moléculas, tais como proteínas, pode ser descrita em vários níveis de complexidade, arranjada em um tipo de hierarquia conceitual. Quatro níveis de estrutura proteica são comumente definidos (**Figura 3-23**). Uma descrição de todas as ligações covalentes

**FIGURA 3-23 Níveis de estrutura nas proteínas.** A *estrutura primária* consiste em uma sequência de aminoácidos unidos por ligações peptídicas e inclui quaisquer pontes dissulfeto. O polipeptídeo resultante pode ser disposto em unidades de *estrutura secundária*, como em uma hélice $\alpha$. A hélice é uma parte da *estrutura terciária* do polipeptídeo dobrado, que é ele mesmo uma das subunidades que compõem a *estrutura quaternária* da proteína multissubunidade, nesse caso a hemoglobina.

(principalmente ligações peptídicas e ligações dissulfeto) ligando resíduos de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica é a sua **estrutura primária**. O elemento mais importante da estrutura primária é a *sequência* de resíduos de aminoácidos. A **estrutura secundária** se refere a arranjos particularmente estáveis de resíduos de aminoácidos dando origem a padrões estruturais recorrentes. A **estrutura terciária** descreve todos os aspectos do enovelamento tridimensional de um polipeptídeo. Quando uma proteína tem duas ou mais subunidades polipeptídicas, seus arranjos no espaço são chamados de **estrutura quaternária**. Nossa exploração de proteínas, por fim, inclui máquinas proteicas complexas que consistem em dezenas de milhares de subunidades. A estrutura primária é o foco do restante deste capítulo; os níveis mais elevados de estrutura são discutidos no Capítulo 4.

As diferenças na estrutura primária podem ser especialmente informativas. Cada proteína tem um número e uma sequência de resíduos de aminoácidos distintos. Como será visto no Capítulo 4, a estrutura primária de uma proteína determina como ela se dobra em sua estrutura tridimensional única, e isso, por sua vez, determina a função da proteína. Em primeiro lugar, serão considerados os indícios empíricos de que a sequência de aminoácidos e a função da proteína são intimamente ligadas; em seguida, será descrito como a sequência de aminoácidos é determinada; e, finalmente, serão destacados os múltiplos usos dessas informações.

## A função de uma proteína depende de sua sequência de aminoácidos

A bactéria *Escherichia coli* produz mais de 3.000 proteínas diferentes; um ser humano tem ~25.000 genes que codificam um número muito maior de proteínas (por meio de processos genéticos discutidos na Parte III deste livro). Em ambos os casos, cada tipo de proteína possui uma sequência de aminoácidos única que confere uma determinada estrutura tridimensional. Essa estrutura, por sua vez, confere uma função específica.

Algumas observações simples ilustram a importância da estrutura primária ou a sequência de aminoácidos de uma proteína. Em primeiro lugar, como já observado, as proteínas com funções diferentes sempre possuem sequências de aminoácidos diferentes. Em segundo lugar, milhares de doenças genéticas humanas foram rastreadas para a produção de proteínas defeituosas. O defeito pode variar de uma simples troca na sequência de aminoácidos (como na anemia falciforme, descrita no Capítulo 5) à deleção de uma porção maior da cadeia polipeptídica (como na maior parte dos casos da distrofia muscular de Duchenne: uma grande deleção no gene que codifica a proteína distrofina leva à produção de uma proteína encurtada e inativa). Finalmente, comparando proteínas funcionalmente semelhantes de diferentes espécies, foi descoberto que essas proteínas frequentemente têm sequências de aminoácidos semelhantes. Portanto, uma ligação íntima entre a estrutura primária da proteína e sua função é evidente.

A sequência de aminoácidos é totalmente fixa ou invariável para uma determinada proteína? Não; alguma flexibilidade é possível. Estima-se que 20 a 30% das proteínas humanas sejam **polimórficas**, possuindo variações nas sequências de aminoácidos na população humana. Muitas dessas variações na sequência têm pouco ou nenhum efeito na função da proteína. Além disso, proteínas que desempenham funções muito semelhantes em espécies distantemente relacionadas podem ser muito diferentes no tamanho geral e na sequência de aminoácidos.

Embora a sequência de aminoácidos em algumas regiões da estrutura primária possa variar consideravelmente sem afetar a função biológica, a maior parte das proteínas contém regiões cruciais que são essenciais para suas funções e cuja sequência é, portanto, conservada. A fração da sequência geral que é crítica varia de proteína para proteína, complicando a tarefa de relacionar a sequência à estrutura tridimensional, e a estrutura à função. Antes de se considerar esse problema com mais detalhe, é preciso, entretanto, examinar como a informação da sequência é obtida.

## As sequências de aminoácidos de milhões de proteínas foram determinadas

Duas grandes descobertas de 1953 tiveram fundamental importância na história da bioquímica. Nesse ano, James D. Watson e Francis Crick deduziram a estrutura em dupla-hélice do DNA e propuseram uma base estrutural para sua replicação precisa (Capítulo 8). Sua proposta iluminou a realidade molecular por trás da ideia de um gene. No mesmo ano, Frederick Sanger descobriu a sequência de resíduos de aminoácidos nas cadeias polipeptídicas do hormônio insulina (**Figura 3-24**), surpreendendo muitos pesquisadores que pensavam há muito tempo que a determinação da sequência de aminoácidos de um polipeptídeo seria uma tarefa irremediavelmente difícil. Rapidamente se tornou evidente que a sequência de nucleotídeos no DNA e a sequência de aminoácidos em proteínas estavam de algum modo relacionadas. Quase uma década após estas descobertas, o código genético foi elucidado, relacionando a sequência de nucleotídeos do DNA à sequência de aminoácidos em moléculas de proteínas (Capítulo 27). As sequências de aminoácidos de proteínas são agora mais frequentemente derivadas indiretamente a partir das sequências de DNA em bancos de dados genômicos. Entretanto, uma série de técnicas derivadas de métodos tradicionais de sequenciamento de polipeptídeos ainda ocupa um lugar importante na química de proteínas. Na sequência, é resumido o método tradicional e mencionadas algumas das técnicas derivadas dele.

Cadeia A $H_3\overset{+}{N}$—GIVEQCCASVCSLYQLENYCN—$COO^-$

Cadeia B $H_3\overset{+}{N}$—FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPLA—$COO^-$

5 10 15 20 25 30

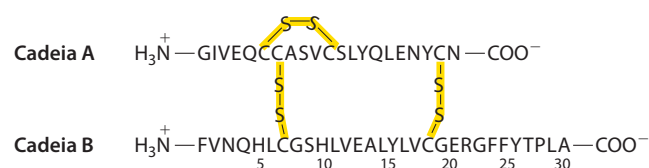
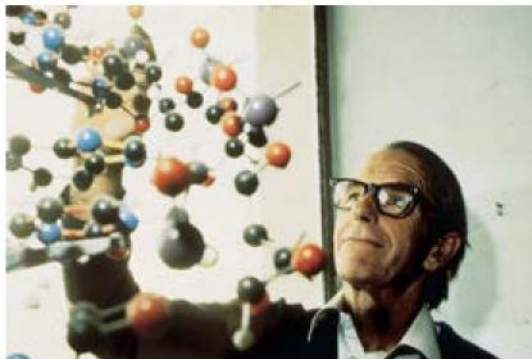



**FIGURA 3-24 Sequência de aminoácidos da insulina bovina.** As duas cadeias de polipeptídeos estão unidas por ligações cruzadas de dissulfeto (amarelo). A cadeia A da insulina é idêntica em humanos, porcos, cães, coelhos e cachalotes. As cadeias B de vacas, porcos, cães, bodes e cavalos são idênticas.

## A química de proteínas é enriquecida por métodos derivados do clássico sequenciamento de polipeptídeos

Os métodos utilizados na década de 1950 por Fred Sanger para determinar a sequência da proteína insulina são resumidos, em sua forma moderna, na **Figura 3-25**. Poucas proteínas são sequenciadas desse modo, atualmente, pelo menos em sua totalidade. Entretanto, esses protocolos de sequenciamento tradicionais têm proporcionado uma rica variedade de ferramentas para os bioquímicos, e quase todas as etapas na Figura 3-25 fazem uso de métodos que são amplamente utilizados, algumas vezes em contextos bastante diferentes.

Frederick Sanger, 1918-2013

No esquema tradicional para sequenciamento de proteínas grandes, o resíduo aminoterminal do aminoácido foi inicialmente marcado e sua identidade determinada. O grupo $\alpha$-aminoterminal pode ser marcado com 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (FDNB), cloreto de dansila ou cloreto de dabsilo (**Figura 3-26**).

O processo de sequenciamento químico em si é baseado em um processo de duas etapas desenvolvido por Pehr Edman (**Figura 3-27**). O procedimento de **degradação de Edman** marca e remove apenas o resíduo aminoterminal de um peptídeo, deixando todas as outras ligações peptídicas intactas. O peptídeo reage com o fenilisotiocianato em condições levemente alcalinas, o que converte o aminoácido aminoterminal em um aduto de feniltiocarbamoil (PTC). A ligação peptídica próxima ao aduto de PTC é, então, clivada em uma etapa efetuada em ácido trifluoracético anídrico, com remoção do aminoácido aminoterminal como um derivado anilinotiazolinona. O aminoácido aminoterminal derivado é extraído com solventes orgânicos, convertido em um derivado da feniltioidantoína mais estável por tratamento com ácido aquoso e, em seguida, identificado. A utilização de reações sequenciais levadas a cabo em condições primeiro básicas e depois em condições ácidas fornece um meio de controlar todo o processo. Cada reação com o aminoácido aminoterminal pode chegar, essencialmente ao fim, sem afetar qualquer outra ligação peptídica no peptídeo. O processo se repete até que, tipicamente, 40 resíduos de aminoácidos sequenciais sejam identificados. As reações da degradação de Edman foram automatizadas.

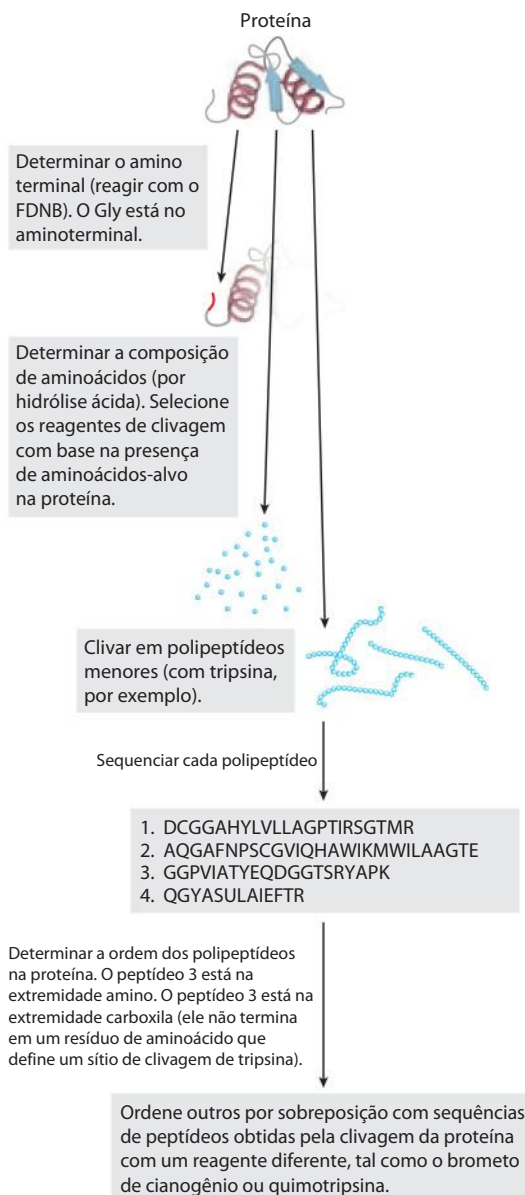



**FIGURA 3-25 Sequenciamento direto de proteínas.** Os procedimentos aqui apresentados foram aqueles desenvolvidos por Fred Sanger para sequenciar a insulina e têm sido usados posteriormente para várias proteínas adicionais. FDNB é 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (ver texto e Figura 3-26).

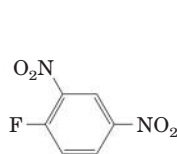
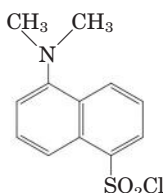
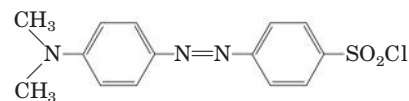
$O_2N$, F, $NO_2$ — FDNB

$CH_3$, $CH_3$, N, $SO_2Cl$ — Cloreto de dansila

$CH_3$, N, $CH_3$, N=N, $SO_2Cl$ — Cloreto de dabsilo

**FIGURA 3-26 Reagentes usados para modificar o grupo $\alpha$-amino do aminoácido terminal.**

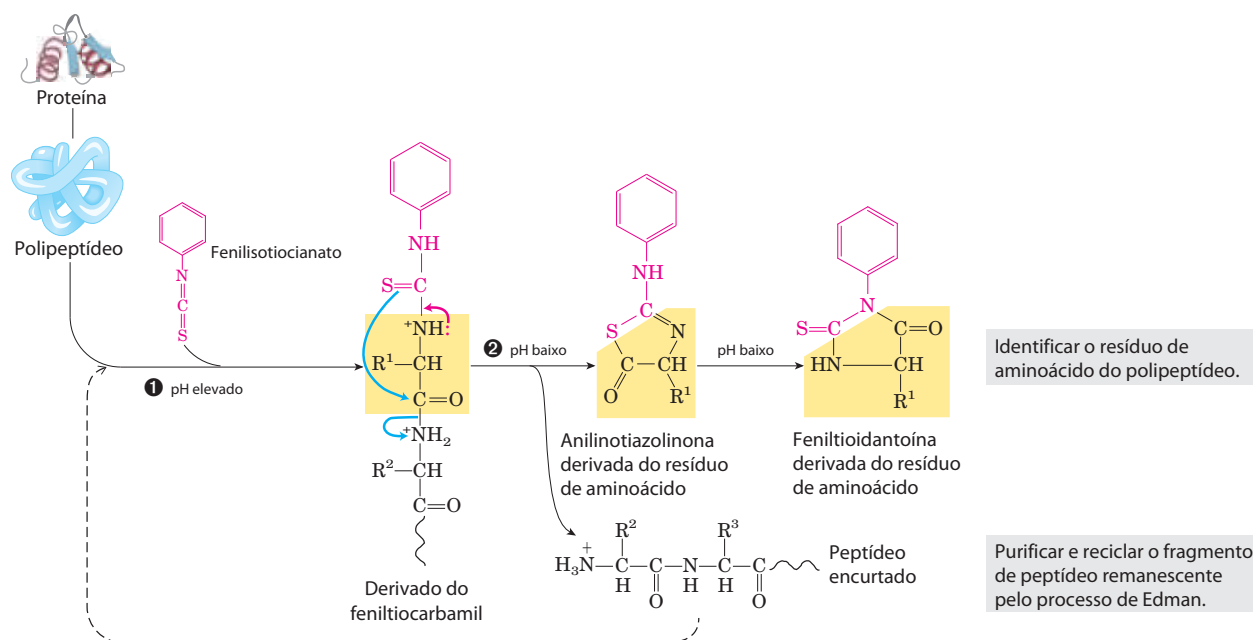



**FIGURA 3-27 A química do sequenciamento de proteínas desenvolvida por Pehr Edman.** A ligação peptídica mais próxima do aminoterminal da proteína ou polipeptídeo é clivada em duas etapas. As duas etapas são levadas a cabo sob condições de reação muito diferentes (condições básicas na etapa ❶ e ácidas na etapa ❷, permitindo que uma etapa prossiga até sua conclusão antes que a segunda se inicie.

Para determinar a sequência de proteínas grandes, os primeiros elaboradores de protocolos de sequenciamento tiveram que desenvolver métodos para eliminar as ligações dissulfeto e para clivar as proteínas com precisão em polipeptídeos menores. Duas abordagens para a degradação irreversível das ligações dissulfeto são destacadas na **Figura 3-28**. As enzimas chamadas **proteases** catalisam a clivagem hidrolítica das ligações peptídicas. Algumas proteases clivam apenas a ligação peptídica adjacente a determinados resíduos de aminoácidos (Tabela 3-6) e, portanto, fragmentam uma cadeia polipeptídica de uma maneira previsível e reproduzível. Poucos reagentes químicos também clivam a ligação peptídica adjacente em resíduos específicos. Entre as proteases, a enzima digestiva tripsina catalisa a hidró-

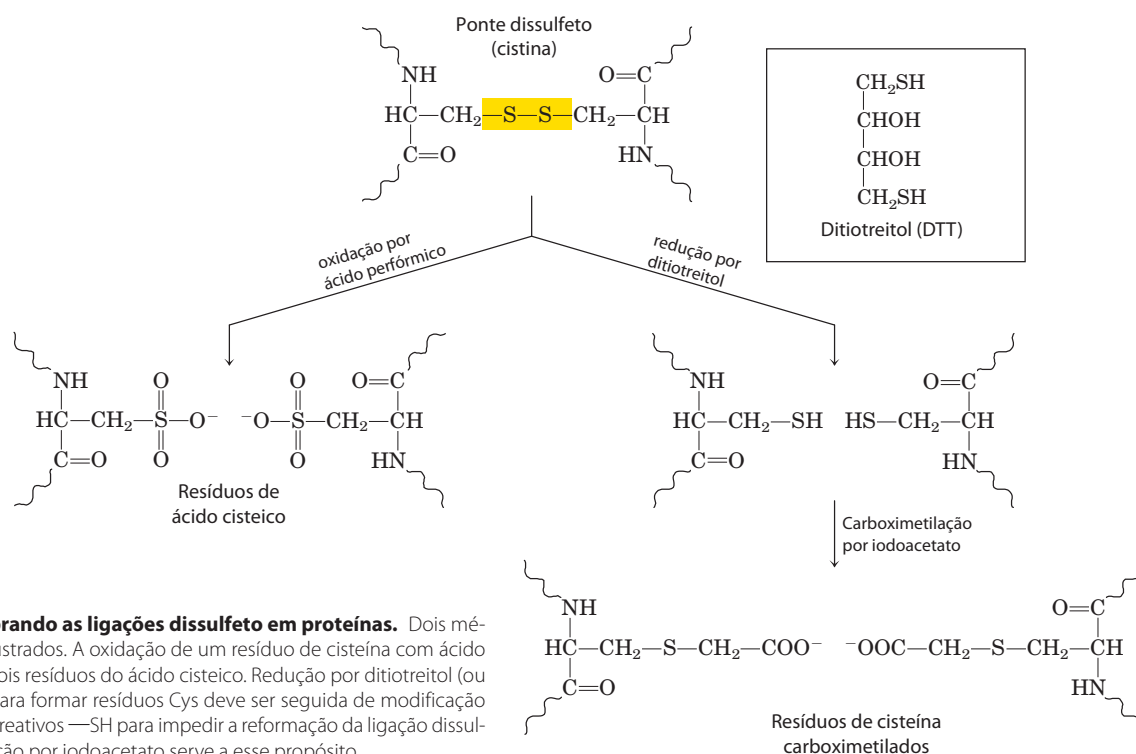



**FIGURA 3-28 Quebrando as ligações dissulfeto em proteínas.** Dois métodos comuns são ilustrados. A oxidação de um resíduo de cisteína com ácido perfórmico produz dois resíduos do ácido cisteico. Redução por ditiotreitol (ou $\beta$-mercaptoetanol) para formar resíduos Cys deve ser seguida de modificação adicional dos grupos reativos —SH para impedir a reformação da ligação dissulfeto. A carboximetilação por iodoacetato serve a esse propósito.

**TABELA 3-6** Especificidade de alguns métodos comuns para fragmentação de cadeias polipeptídicas

| Reagente (fonte biológica)* | Pontos de quebra† |
|---|---|
| Tripsina (pâncreas bovino) | Lys, Arg (C) |
| Protease submaxilar (glândula submaxilar de camundongos) | Arg (C) |
| Quimotripsina (pâncreas bovino) | Phe, Trp, Tyr (C) |
| Protease V8 de *Staphylococcus aureus* (bactéria *S. aureus*) | Asp, Glu (C) |
| Asp-*N*-protease (bactéria *Pseudomonas fragi*) | Asp, Glu (N) |
| Pepsina (estômago porcino) | Leu, Phe, Trp, Tyr (N) |
| Endopeptidase Lys C (bactéria *Lysobacter enzymogenes*) | Lys (C) |
| Brometo de cianogênio | Met (C) |

*Todos os reagentes, com exceção do brometo de cianogênio, são proteases. Todos estão disponíveis a partir de fontes comerciais.
†Resíduos fornecendo o ponto principal de reconhecimento para a protease ou reagentes; a quebra da ligação peptídica ocorre ou no lado carbonílico (C) ou no lado amino (N) dos resíduos de aminoácidos indicados.

lise apenas daquelas ligações peptídicas em que o grupo carbonila é fornecido tanto por um resíduo de Lys quanto um de Arg, independente do comprimento ou da sequência de aminoácidos da cadeia. Um polipeptídeo com três resíduos Lys e/ou Arg irá normalmente gerar quatro peptídeos menores na clivagem com a tripsina. Além disso, todos, exceto um deles, terão um terminal carboxila Lys ou Arg. A escolha de um reagente para clivar a proteína em peptídeos menores pode ser auxiliada, primeiro, determinando-se o conteúdo de aminoácidos de toda a proteína, empregando ácido para reduzir a proteína a seus aminoácidos constituintes. A tripsina seria utilizada apenas em proteínas com um número adequado de resíduos de Lys ou Arg.

No sequenciamento clássico, uma proteína grande seria clivada em fragmentos duas vezes, utilizando uma protease ou um reagente de clivagem diferente a cada vez, de modo que as extremidades finais dos fragmentos fossem diferentes. Ambos os conjuntos de fragmentos seriam purificados e sequenciados. A ordem em que os fragmentos apareceram na proteína original poderia então ser determinada pela análise das sobreposições na sequência entre os dois conjuntos de fragmentos.

Mesmo não sendo mais utilizados para sequenciar proteínas inteiras, os métodos de sequenciamento tradicionais ainda são valiosos no laboratório. O sequenciamento de alguns aminoácidos a partir da terminação amino utilizando a química de Edman é frequentemente suficiente para confirmar a identidade de uma proteína conhecida que acabou de ser purificada ou para identificar uma proteína desconhecida purificada com base em sua atividade incomum. As técnicas empregadas nas etapas individuais do método de sequenciamento tradicional também são úteis para outros propósitos. Por exemplo, os métodos utilizados para quebrar as ligações dissulfeto podem também ser utilizados para desnaturar proteínas quando isto é necessário. Além disso, os esforços para marcar o resíduo de aminoácido aminoterminal levaram eventualmente ao desenvolvimento de uma série de reagentes que poderiam reagir com grupos específicos em uma proteína. Os mesmos reagentes utilizados para marcar o grupo $\alpha$-amino aminoterminal podem ser empregados para marcar as aminas primárias dos resíduos Lys (Figura 3-26). O grupo sulfidrila nos resíduos Cys pode ser modificado com iodoacetamidas, maleimidas, benzil halidas e bromometil cetonas (**Figura 3-29**). Outros resíduos de aminoácidos podem ser modificados por reagentes ligados a um corante ou outra molécula para auxiliar na detecção da proteína ou em estudos funcionais.

$I-CH_2-C(=O)-NH_2$ Iodoacetamida

Maleimida

Brometo de benzila (um hálido de benzila)

Cetonas bromometil (o X pode variar)

**FIGURA 3-29 Reagentes usados para modificar os grupos sulfidrila dos resíduos Cys.** (Ver também Figura 3-28.)

## A espectrometria de massa oferece um método alternativo para determinar sequências de aminoácidos

Adaptações modernas da **espectrometria de massa** fornecem uma importante alternativa aos métodos de sequenciamento descritos anteriormente. A espectrometria de massa pode fornecer uma medida altamente precisa da massa molecular de uma proteína, mas também pode fazer muito mais. Em especial, algumas variantes da espectrometria de massa podem fornecer muito rapidamente sequências de múltiplos pequenos segmentos de polipeptídeos (20 a 30 resíduos de aminoácidos) em uma amostra de proteína.

O espectrômetro de massa tem sido há muito tempo uma ferramenta indispensável na química. As moléculas a serem analisadas, chamadas de **analitos**, são inicialmente ionizadas no vácuo. Quando as moléculas recém-carregadas são introduzidas em um campo elétrico e/ou magnético, seus caminhos através do campo são uma função da razão de suas massas em relação às suas cargas, $m/z$. Essa propriedade medida de amostras ionizadas pode ser utilizada para deduzir a massa ($m$) do analito com muita precisão.

Embora a espectrometria de massa esteja sendo utilizada há muitos anos, ela não poderia ser aplicada a macromoléculas, tais como proteínas e ácidos nucleicos. As medições de *m/z* são realizadas em moléculas na fase gasosa, e o aquecimento e outros tratamentos necessários para transferir uma macromolécula para a fase gasosa geralmente provocam sua rápida decomposição. Em 1988, duas técnicas diferentes foram desenvolvidas para superar esse problema. Em uma, as proteínas são colocadas em uma matriz absorvedora de luz. Com um pulso curto de luz a laser, as proteínas são ionizadas e, em seguida, dessorvidas da matriz no sistema de vácuo. Esse processo, conhecido como **espectrometria de massas de dessorção/ionização a *laser* assistida por matriz** ou **MALDI MS**, tem sido utilizada com sucesso para medir a massa de uma ampla variedade de macromoléculas. Em um segundo e bem-sucedido método, as macromoléculas em solução são forçadas diretamente da fase líquida para a gasosa. Uma solução de analitos é passada através de uma agulha carregada que é mantida em um alto potencial elétrico, dispersando a solução em uma névoa fina de microgotas carregadas. Os solventes que circundam as macromoléculas evaporam rapidamente, deixando íons de macromoléculas carregadas multiplamente na fase gasosa. Essa técnica é chamada de **espectrometria de massa com ionização por eletroaspersão**, ou **ESI MS**. Os prótons adicionados durante a passagem através da agulha fornecem carga adicional à macromolécula. O *m/z* da molécula pode ser analisado na câmara de vácuo.

A espectrometria de massa fornece uma riqueza de informações para a pesquisa proteômica, a enzimologia e a química de proteínas em geral. As técnicas exigem apenas quantidades minúsculas de amostra, de modo que podem ser rapidamente aplicadas a pequenas quantidades de proteína que podem ser extraídas de uma eletroforese em gel bidimensional. A medição precisa da massa molecular de uma proteína é crítica para sua identificação. Uma vez que a massa de uma proteína seja conhecida precisamente, a espectrometria de massa é um método conveniente e preciso para detectar alterações na massa devido à presença de cofatores ligados, íons metálicos ligados, modificações covalentes e assim por diante.

O processo para a determinação da massa molecular de uma proteína com ESI MS é ilustrado na **Figura 3-30**. À medida que é injetada na fase gasosa, uma proteína adquire um número variável de prótons e, portanto, cargas positivas, a partir do solvente. A adição variável dessas cargas cria um espectro de espécies com diferentes razões massa/carga. Cada pico sucessivo corresponde a uma espécie que difere do seu pico vizinho por uma diferença de carga de 1 e uma diferença de massa de 1 (1 próton). A massa da proteína pode ser determinada a partir de dois picos consecutivos.

A espectrometria de massa também pode ser utilizada para sequenciar trechos curtos de polipeptídeos, uma aplicação que surgiu como uma ferramenta inestimável para identificação rápida de proteínas desconhecidas. A informação da sequência é extraída utilizando-se uma técnica chamada de **tandem MS** ou **MS/MS**. Uma solução contendo a proteína investigada é inicialmente tratada com uma protease ou reagente químico para hidrolisá-la a uma mistura de peptídeos menores. A mistura, em seguida, é injetada em um equipamento que é essencialmente formado por

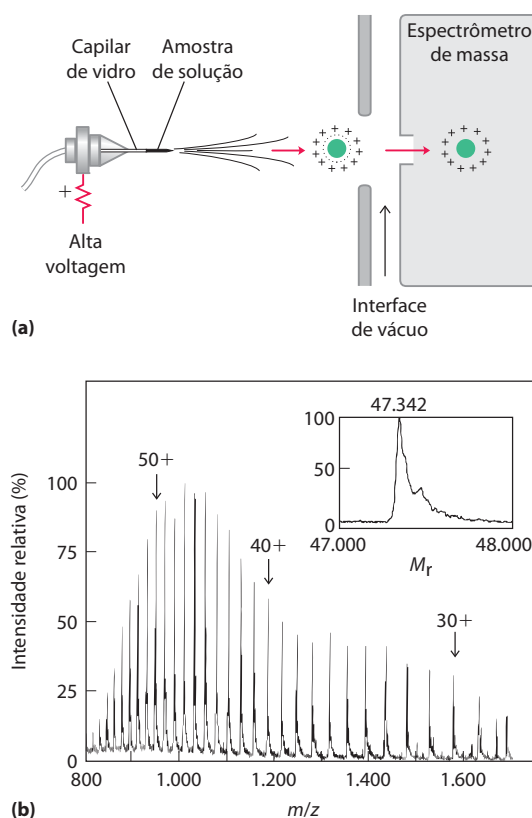



**FIGURA 3-30 Espectrometria de massa com ionização por eletroaspersão de uma proteína.** **(a)** Uma solução de proteína é dispersa em gotículas altamente carregadas pela passagem através de uma agulha sob a influência de um campo elétrico de alta voltagem. As gotículas evaporam e os íons (com prótons adicionados, nesse caso) entram no espectrômetro de massa para medição de *m/z*. O espectro gerado **(b)** é uma família de picos, com cada pico sucessivo (da direita para a esquerda) correspondendo a uma espécie carregada com massa e carga aumentados em 1. A inserção mostra uma transformação desse espectro gerada por computador.

dois espectrômetros de massa em tandem (**Figura 3-31a**, em cima). No primeiro, a mistura de peptídeos é disposta de modo que apenas um dos vários tipos de peptídeos produzidos pela clivagem surge na outra extremidade.

A amostra do peptídeo selecionado, cada molécula do qual possui uma carga em algum ponto ao longo de seu comprimento, se desloca então através de uma câmara de vácuo entre os dois espectrômetros de massa. Nesse compartimento de colisão, o peptídeo é fragmentado adicionalmente por impacto de alta energia com um "gás de colisão", tal como o hélio ou o argônio, que é colocado na câmara de vácuo. Cada peptídeo individual é quebrado em apenas um local, em média. Embora as quebras não sejam hidrolíticas, a maior parte ocorre nas ligações peptídicas.

O segundo espectrômetro de massa mede, em seguida, as razões *m/z* de todos os fragmentos carregados. Esse processo gera um ou mais conjuntos de picos. Um determinado conjunto de picos (Figura 3-31b) consiste em todos os fragmentos carregados que foram gerados pela quebra do mesmo tipo de ligação (mas em diferentes pontos no peptídeo). Um conjunto de picos inclui apenas os fragmentos nos quais a carga foi retida no lado aminoterminal das ligações quebradas; outro inclui apenas os fragmentos nos

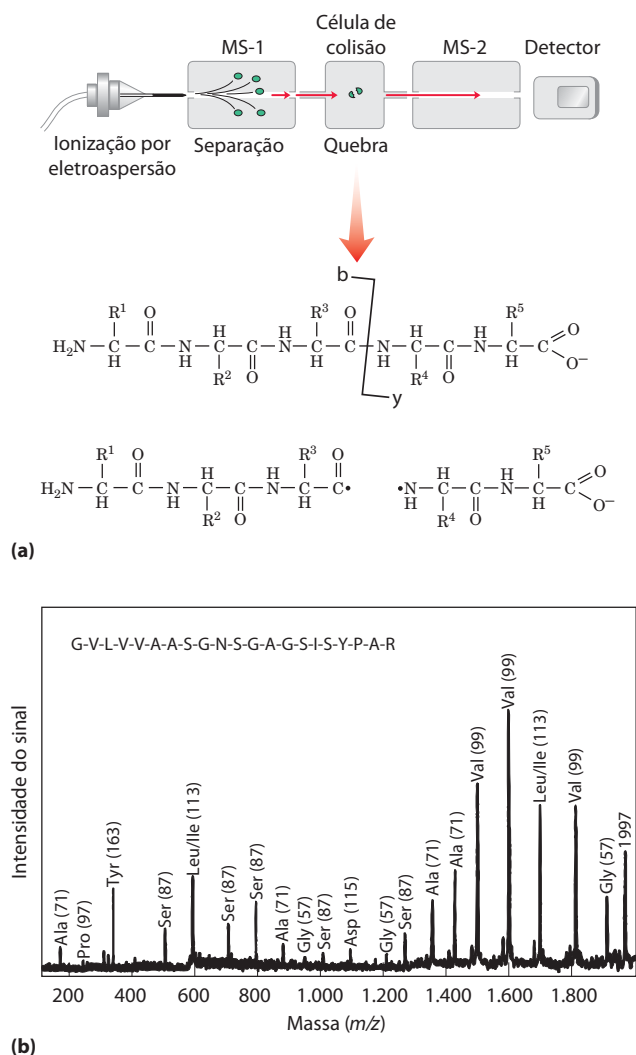



**FIGURA 3-31 Obtendo informação da sequência proteica com MS em tandem. (a)** Após a hidrólise proteolítica, uma solução proteica é injetada em um espectrômetro de massa (MS-1). Os diferentes peptídeos são dispostos de modo que apenas um tipo é selecionado para análise adicional. O peptídeo selecionado é fragmentado em uma câmara entre dois espectrômetros de massa, e a *m/z* para cada fragmento é medida no segundo espectrômetro de massa (MS-2). Muitos dos íons gerados nessa segunda fragmentação resultam da quebra da ligação peptídica, como mostrado. Eles são chamados de íons tipo b ou íons tipo y, dependendo se a carga é retida no lado aminoterminal ou carboxiterminal, respectivamente. **(b)** Espectro típico com picos representando os fragmentos de peptídeos gerados a partir de uma amostra de um peptídeo pequeno (21 resíduos). Os picos marcados são íons tipo y derivados de resíduos de aminoácidos. O número entre parênteses acima de cada pico é a massa molecular do íon do aminoácido. Os picos sucessivos diferem pela massa de um aminoácido particular no peptídeo original. A sequência deduzida é mostrada no topo.

quais a carga foi retida no lado carboxiterminal das ligações quebradas. Cada pico sucessivo em um determinado conjunto tem um aminoácido a menos que o pico anterior. A diferença na massa de pico para pico identifica o aminoácido que foi perdido em cada caso, revelando, portanto, a sequência do peptídeo. As únicas ambiguidades envolvem a leucina e a isoleucina, que têm a mesma massa. Embora múltiplos conjuntos de picos sejam normalmente gerados, os dois conjuntos mais proeminentes geralmente consistem em fragmentos carregados derivados da quebra das ligações peptídicas. A sequência de aminoácidos derivada de um conjunto pode ser confirmada pela outra, melhorando a confiança na informação da sequência obtida.

Os vários métodos para obtenção da informação de sequências proteicas se complementam. O procedimento da degradação de Edman é algumas vezes conveniente para obter a informação da sequência unicamente a partir do terminal amino de uma proteína ou peptídeo. Entretanto, ele é relativamente lento e requer uma amostra maior do que a espectrometria de massa. A espectrometria de massa pode ser utilizada para pequenas quantidades de amostras e para amostras misturadas. Ela fornece a informação da sequência, mas os processos de fragmentação podem deixar lacunas imprevisíveis na sequência. Embora a maior parte das sequências de proteínas seja atualmente extraída de sequências do DNA genômico (Capítulo 9), empregando-se a compreensão do código genético (Capítulo 27), o sequenciamento direto de proteínas é, com frequência, necessário para identificar amostras de proteínas desconhecidas. Ambos os métodos de sequenciamento de proteínas permitem a identificação não ambígua de proteínas recém-purificadas. A espectrometria de massa é o método de escolha para identificar proteínas que estão presentes em pequenas quantidades. Por exemplo, a técnica é sensível o suficiente para analisar algumas centenas de nanogramas de proteínas que podem ser extraídos de uma única banda de proteína em um gel de poliacrilamida. O sequenciamento direto por espectrometria de massa também pode revelar a adição de grupos fosforil ou outras modificações (Capítulo 6). O sequenciamento por qualquer um dos métodos pode revelar mudanças na sequência de proteínas que resultam da edição do RNA mensageiro em eucariontes (Capítulo 26). Portanto, todos esses métodos são parte de uma caixa de ferramentas robusta utilizada para investigar as proteínas e suas funções.

## Pequenos peptídeos e proteínas podem ser sintetizados quimicamente

Muitos peptídeos são potencialmente úteis como agentes farmacológicos e sua produção é de considerável importância comercial. Há três modos de se obter um peptídeo: (1) purificação a partir de tecidos, tarefa frequentemente de difícil realização em consequência das concentrações infinitamente baixas de alguns peptídeos; (2) engenharia genética (Capítulo 9); ou (3) síntese química direta. Atualmente, técnicas poderosas tornam a síntese química direta uma opção atrativa em muitos casos. Além das aplicações comerciais, a síntese de porções peptídicas específicas de proteínas maiores é uma ferramenta cada vez mais importante no estudo da estrutura e função das proteínas.

A complexidade das proteínas torna as abordagens sintéticas tradicionais da química orgânica impraticáveis para peptídeos com mais de quatro ou cinco resíduos de aminoácidos. Um problema é a dificuldade de purificação do produto após cada etapa.

O principal avanço nessa tecnologia foi fornecido por R. Bruce Merrifield em 1962. Sua inovação foi sintetizar um peptídeo enquanto o mantinha ligado a uma extremidade de um suporte sólido. O suporte é um polímero insolúvel (resina) contido no interior de uma coluna, semelhante ao utilizado

em procedimentos cromatográficos. O peptídeo é construído sobre esse suporte, um aminoácido de cada vez, por meio de um conjunto padrão de reações em um ciclo repetitivo (**Figura 3-32**). Em cada etapa sucessiva no ciclo, grupos químicos de proteção bloqueiam as reações indesejadas.

A tecnologia para a síntese de peptídeos químicos é atualmente automatizada. Uma limitação importante do processo (limitação compartilhada com o processo de sequenciamento da degradação de Edman) é a eficiência de cada ciclo químico, como pode ser observado calculando a

**FIGURA 3-32 Síntese química de um peptídeo em um suporte de polímero insolúvel.** As reações ❶ a ❹ são necessárias para a formação de cada ligação peptídica. O grupo 9-fluorenilmetoxicarbonila (Fmoc) (sombreado em azul) impede reações indesejadas no grupo α-amino do resíduo (sombreado em cor salmão). A síntese química prossegue da terminação carboxila para a terminação amino, o sentido inverso da síntese proteica *in vivo* (Capítulo 27).

**TABELA 3-7** Efeito do rendimento de cada etapa no rendimento global da síntese de peptídeos

| Número de resíduos no polipeptídeo final | Rendimento geral do peptídeo final (%) quando o rendimento de cada etapa é: | |
|---|---|---|
| | 96,0% | 99,8% |
| 11 | 66 | 98 |
| 21 | 44 | 96 |
| 31 | 29 | 94 |
| 51 | 13 | 90 |
| 100 | 1,8 | 82 |

produção total de peptídeos de vários comprimentos, quando o rendimento por adição de cada novo aminoácido é de 96,0% *versus* 99,8% (Tabela 3-7).

A reação incompleta em uma fase pode levar à formação de uma impureza (na forma de um peptídeo mais curto) na próxima. A química foi otimizada para permitir a síntese de proteínas de 100 resíduos de aminoácidos em poucos dias com rendimento razoável. Uma abordagem muito semelhante é utilizada para a síntese de ácidos nucleicos (ver Figura 8-35). É interessante notar que essa tecnologia, impressionante como é, ainda é pequena quando comparada aos processos biológicos. A mesma proteína de 100 resíduos poderia ser sintetizada com extraordinária fidelidade em cerca de 5 segundos em uma célula bacteriana.

Vários métodos novos para a ligação (união) eficiente de peptídeos tornaram possível a reunião de peptídeos sintéticos em polipeptídeos maiores e proteínas. Com esses métodos, novas formas de proteínas podem ser criadas com grupos químicos posicionados precisamente, incluindo aquelas que normalmente não podem ser encontradas em uma proteína celular. Essas novas formas fornecem novos caminhos para testar teorias de catálise enzimática, para criar proteínas com novas propriedades químicas e para desenhar sequências de proteínas que irão se dobrar em estruturas particulares. Esta última aplicação fornece o último teste de nossa capacidade crescente de relacionar a estrutura primária de um peptídeo com a estrutura tridimensional que ele assume na solução.

## As sequências de aminoácidos fornecem importantes informações bioquímicas

O conhecimento da sequência de aminoácidos em uma proteína pode oferecer ideias sobre sua estrutura tridimensional e função, localização celular e evolução. A maior parte destas ideias é derivada da procura de semelhanças entre uma proteína de interesse e as proteínas previamente estudadas. Milhares de sequências são conhecidas e estão disponíveis em bancos de dados acessíveis pela internet. Uma comparação de uma sequência recentemente obtida com este grande banco de sequências armazenadas frequentemente revela relações tanto surpreendentes quanto esclarecedoras.

Não é compreendido em detalhes como uma sequência de aminoácidos determina uma estrutura tridimensional e tampouco é possível sempre prever a função a partir da sequência. Entretanto, famílias de proteínas com algumas características estruturais ou funcionais compartilhadas podem ser prontamente identificadas com base nas semelhanças nas suas sequências de aminoácidos. Proteínas individuais são associadas a famílias com base no grau de semelhança nas sequências de aminoácidos. Membros de uma família são geralmente idênticos em 25% ou mais de suas sequências e as proteínas nessas famílias geralmente compartilham pelo menos algumas características estruturais e funcionais. Algumas famílias são definidas, no entanto, pelas identidades envolvendo somente alguns poucos resíduos de aminoácidos que são críticos para uma determinada função. Diversas subestruturas semelhantes, ou "domínios" (a serem definidos com mais detalhes no Capítulo 4), ocorrem em muitas proteínas funcionalmente independentes. Estes domínios com frequência se dobram em configurações estruturais que possuem um grau incomum de estabilidade ou que são especializadas para um ambiente específico. Relações evolutivas também podem ser inferidas a partir das semelhanças estruturais e funcionais entre famílias de proteínas.

Certas sequências de aminoácidos funcionam como sinais que determinam a localização celular, a modificação química e a meia-vida de uma proteína. Sequências de sinalização específicas, frequentemente na porção aminoterminal, são utilizadas para direcionar certas proteínas para a exportação a partir da célula; outras proteínas são direcionadas para a distribuição para o núcleo, para a superfície celular, o citosol ou outras localizações celulares. Outras sequências atuam como sítios de ligação para grupos prostéticos, tais como os grupos de açúcares em glicoproteínas e lipídeos em lipoproteínas. Alguns desses sinais são bem caracterizados e são facilmente reconhecíveis na sequência de uma proteína recentemente caracterizada (Capítulo 27).

**CONVENÇÃO-CHAVE:** Muito da informação funcional encapsulada nas sequências de proteínas surge na forma de **sequências consenso**. Este termo é aplicado a sequências de DNA, RNA ou proteínas. Quando uma série de sequências de ácidos nucleicos ou de proteínas relacionadas é comparada, uma sequência consenso é aquela que reflete a base ou o aminoácido mais frequente em cada posição. Partes da sequência que apresentam concordância particularmente boa frequentemente representam domínios funcionais conservados evolutivamente. Diversas ferramentas matemáticas disponíveis na Internet podem ser utilizadas para gerar sequências consenso ou identificá-las nos bancos de dados de sequências. O Quadro 3-2 ilustra convenções comuns para a apresentação de sequências consenso. ■

## Sequências de proteínas podem elucidar a história da vida na Terra

A cadeia simples de letras que denota a sequência de aminoácidos de uma proteína tem uma riqueza surpreendente de informações. À medida que mais sequências de proteínas se tornaram disponíveis, o desenvolvimento de métodos mais poderosos para extrair informações a partir delas se tornou um importante empreendimento bioquímico. A análise das informações disponíveis nos muitos e sempre crescentes bancos de dados biológicos, incluindo as sequências

## QUADRO 3-2 Sequências consenso e logos de sequências

Sequências consenso podem ser representadas de várias maneiras. Para ilustrar dois tipos de convenções, utilizamos dois exemplos de sequências consenso, mostrados na Figura 1: (a) estrutura de ligação ao ATP denominada alça P (ver Quadro 12–2) e (b) estrutura de ligação ao $Ca^{2+}$ denominada mão EF (ver Figura 12–11). As regras descritas aqui são adaptadas daquelas utilizadas pela comparação de sequências do *website* PROSITE (expasy.org/prosite); elas utilizam os códigos padrão de uma letra para cada aminoácido.

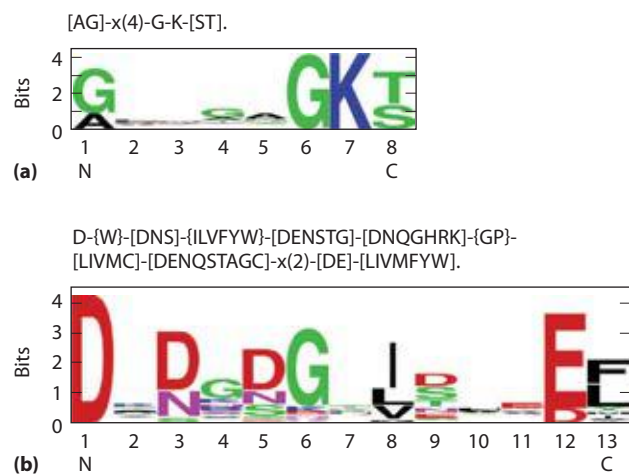



**FIGURA Q-1 Representações de duas sequências de consenso. (a)** Alça P, estrutura ligadora de ATP; **(b)** mão EF, estrutura ligadora de $Ca^{2+}$.

Em um tipo de designação de sequência consenso (mostrado na parte superior de (a) e (b)), cada posição é separada de seu vizinho por um hífen. Uma posição em que qualquer aminoácido é permitido é designada x. As ambiguidades são indicadas listando os aminoácidos aceitáveis para uma determinada posição entre colchetes. Por exemplo, em (a) [AG] significa Ala ou Gly. Se todos, exceto alguns, aminoácidos são permitidos em uma posição, os aminoácidos *não* permitidos são listados entre chaves. Por exemplo, em (b) {W} significa qualquer aminoácido, exceto Trp. A repetição de um elemento do padrão é indicada seguindo esse elemento com um número ou uma série de números entre parênteses. Em (a), por exemplo, x(4) significa x-x-x-x; x(2,4) significaria x-x ou x-x-x ou x-x-x-x. Quando um padrão é restrito ou ao grupo amino ou ao grupo carboxila terminal de uma sequência, esse padrão começa com $<$ ou termina com $>$, respectivamente (não é o caso dos dois exemplos citados). Um ponto termina o padrão. Aplicando essas regras à sequência consenso em (a), tanto A como G podem ser encontrados na primeira posição. Qualquer aminoácido pode ocupar as quatro próximas posições, seguidos por um G e um K invariáveis. A última posição pode ser um S ou T.

Logos de sequência fornecem uma representação mais informativa e gráfica do alinhamento de sequência múltipla de um aminoácido (ou ácido nucleico). Cada logo consiste em uma pilha de símbolos para cada posição na sequência. A altura total da pilha (em bits) indica o grau de conservação da sequência naquela posição, enquanto a altura de cada símbolo na pilha indica a frequência relativa daquele aminoácido ou (nucleotídeo). Para sequências de aminoácidos, as cores representam as características do aminoácido: polar (G, S, T, Y, C, Q, N) verde; básico (K, R, H) azul; ácido (D, E) vermelho; e hidrofóbico (A, V, L, I, P, W, F, M) preto. Neste esquema, a classificação de aminoácidos é um pouco diferente daquela na Tabela 3-1 e na Figura 3-5. Os aminoácidos com cadeias laterais aromáticas são agrupados às classificações apolares (F, W) e polares (Y). A glicina, sempre difícil de agrupar, é colocada no grupo polar. Observe que quando múltiplos aminoácidos são aceitáveis em uma posição específica, eles raramente ocorrem com igual probabilidade. Um ou poucos em geral predominam. A representação logo torna o predomínio claro e uma sequência conservada de uma proteína torna-se óbvia. Entretanto, o logo obscurece alguns resíduos de aminoácidos que podem ser permitidos em uma posição, tal como o Cys que ocorre ocasionalmente na posição 8 da mão EF em (b).

de genes e proteínas e as estruturas de macromoléculas, deram origem ao novo campo da **bioinformática**. Um dos resultados dessa disciplina é um conjunto crescente de programas de computador, muito rapidamente disponíveis na internet, que podem ser utilizados por qualquer cientista, estudante ou leigo interessado no assunto. A função de cada proteína depende de sua estrutura tridimensional, que, por sua vez, é determinada em grande parte por sua estrutura primária. Portanto, a informação transmitida por uma sequência de proteínas é limitada apenas por nossa própria compreensão dos princípios estruturais e funcionais. As ferramentas de bioinformática em constante evolução tornam possível identificar os segmentos funcionais em novas proteínas e ajudam a estabelecer tanto suas sequências quanto suas relações estruturais com proteínas já encontradas nos bancos de dados. Em um nível diferente de investigação, as sequências de proteínas estão começando a demonstrar como as proteínas evoluíram e, em última instância, como a vida evoluiu neste planeta.

O campo da evolução molecular é frequentemente relacionado a Emile Zuckerkandl e Linus Pauling, cujos trabalhos em meados de 1960 introduziram o uso de sequências de nucleotídeos e proteínas para investigar a evolução. A premissa não é tão simples quanto aparenta. Se dois organismos são proximamente relacionados, as sequências de seus genes e proteínas devem ser semelhantes. As sequências divergem crescentemente à medida que a distância evolutiva entre dois organismos aumenta. A promessa dessa abordagem começou a ser compreendido na década de 1970, quando Carl Woese utilizou sequências de RNA ribossomal para definir as arqueias como um grupo de organismos vivos distinto de bactérias e eucariotos (ver Figura 1-4). As sequên-

cias de proteínas oferecem uma oportunidade para refinar significativamente a informação disponível. Com o advento de projetos de genoma investigando organismos de bactérias a seres humanos, o número de sequências disponíveis está crescendo a uma velocidade enorme. Essa informação pode ser utilizada para traçar a história biológica. O desafio está em aprender a ler os hieróglifos genéticos.

A evolução não tomou um caminho linear simples. As complexidades são abundantes em qualquer tentativa de extrair a informação evolutiva armazenada em sequências de proteínas. Para determinada proteína, os resíduos de aminoácidos essenciais para a atividade da proteína são conservados ao longo do tempo evolutivo. Os resíduos menos importantes para o funcionamento podem variar ao longo do tempo – isto é, um aminoácido pode ser substituído por outro – e esses resíduos variáveis podem fornecer a informação para traçar a evolução. Entretanto, as substituições de aminoácidos não são sempre aleatórias. Em algumas posições na estrutura primária, a necessidade de manter a função proteica pode significar que apenas determinadas substituições de aminoácidos podem ser toleradas. Algumas proteínas têm resíduos de aminoácidos mais variáveis que outras. Por essas e outras razões, proteínas diferentes podem evoluir em velocidades diferentes.

Outro fator complicador em traçar a história evolutiva é a rara transferência de um gene ou grupo de genes de um organismo para outro, um processo denominado **transferência gênica horizontal**. Os genes transferidos podem ser muito semelhantes aos genes dos quais eles foram derivados no organismo original, enquanto a maior parte dos outros genes nos mesmos dois organismos pode estar relacionada de modo muito distante. Um exemplo de transferência gênica horizontal é a recente rápida dispersão de genes de resistência a antibióticos em populações bacterianas. As proteínas derivadas desses genes transferidos não seriam bons candidatos para o estudo da evolução bacteriana, pois compartilham apenas uma história evolutiva muito limitada com seus organismos "hospedeiros".

O estudo da evolução molecular geralmente se concentra em famílias de proteínas intimamente relacionadas. Na maior parte dos casos, as famílias escolhidas para análise têm funções essenciais no metabolismo celular que deviam ter estado presentes nas primeiras células viáveis, reduzindo, portanto, enormemente a chance de que tenham sido introduzidas há relativamente pouco tempo por transferência gênica horizontal. Por exemplo, uma proteína chamada de EF-1$\alpha$ (fator de alongamento 1$\alpha$) está envolvida na síntese de proteínas em todos os eucariontes. Uma proteína semelhante, EF-Tu, com a mesma função, é encontrada em bactérias. As semelhanças na sequência e na função indicam que a EF-1$\alpha$ e a EF-Tu são membros de uma família de proteínas que compartilham um ancestral comum. Os membros de famílias de proteínas são denominados **proteínas homólogas** ou **homólogos**. O conceito de um homólogo pode ser mais aperfeiçoado. Se duas proteínas em uma família (isto é, dois homólogos) estão presentes nas mesmas espécies, elas são chamadas de **parálogos**. Homólogos de espécies diferentes são denominados **ortólogos**. O processo de rastrear a evolução envolve, primeiramente, a identificação de famílias adequadas de proteínas homólogas e, então, sua utilização para reconstruir as vias evolutivas.

Os homólogos são identificados pelo uso de programas de computador cada vez mais potentes que comparam diretamente duas ou mais sequências de proteínas escolhidas ou pesquisam vastos bancos de dados para descobrir os parentes evolutivos de uma sequência proteica selecionada. O processo de busca eletrônica pode ser entendido como o deslizamento de uma sequência sobre outra até que seja encontrada uma secção com boa correspondência. Nesse alinhamento de sequências, uma pontuação positiva é atribuída para cada posição onde os resíduos de aminoácidos nas duas sequências sejam idênticos – o valor da pontuação varia de um programa para o outro – para fornecer uma medida da qualidade do alinhamento. O processo tem certas complicações. Algumas vezes as proteínas comparadas apresentam correspondência, por exemplo, em dois segmentos de sequência, e esses segmentos estão conectados por sequências menos relacionadas de comprimentos diferentes. Assim, os dois segmentos correspondentes não podem ser alinhados ao mesmo tempo. Para contornar isso, o programa de computador introduz "lacunas" em uma das sequências para registrar os segmentos correspondentes (**Figura 3-33**). É claro que, se for introduzido um número suficiente de lacunas, quaisquer duas sequências poderiam ser colocadas em algum tipo de alinhamento. Para evitar alinhamentos sem informações significativas, os programas incluem penalidades para cada lacuna introduzida, reduzindo, portanto, a pontuação global do alinhamento. Com um método de tentativa e erro eletrônico, o programa seleciona o alinhamento com a pontuação ideal que maximiza os resíduos de aminoácidos idênticos enquanto minimiza a introdução de lacunas.

Com frequência, encontrar aminoácidos idênticos é inadequado para identificar proteínas relacionadas ou, principalmente, para determinar o quão proximamente relacionadas são as proteínas em uma escala de tempo evolutiva. Uma análise mais útil também leva em conta as propriedades químicas dos aminoácidos substituídos. Muitas das diferenças de aminoácidos no interior de uma família de proteínas podem ser conservativas – isto é, um resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo com propriedades químicas semelhantes. Por exemplo, um resíduo Glu pode substituir em um membro da família o resíduo Asp encontrado em outra; ambos os aminoácidos são carregados negativamente. Tal substituição conservativa deveria logicamente receber uma

```
Escherichia coli   TGNRTIAVYDLGGGTFDISIIEIDEVDGEKTFEVLATNGDTHLGGEDFDSRLIHYL
Bacillus subtilis  DEDQTILLYDLGGGTFDVSILELGDG    TFEVRSTAGDNRLGGDDFDQVIIDHL
                                             └──┘
                                           Intervalo
```

**FIGURA 3-33 Alinhando sequências de proteínas com o uso de intervalos.** Aqui é mostrada a sequência de alinhamento de uma curta secção das proteínas Hsp70 (classe muito difundida de chaperonas dobradoras de proteínas) de duas espécies de bactérias muito bem estudadas, *E. coli* e *Bacillus subtilis*. A introdução de um intervalo na sequência de *B. subtilis* permite um melhor alinhamento dos resíduos de aminoácidos de cada lado do intervalo. Resíduos de aminoácidos idênticos estão sombreados.

pontuação maior em um alinhamento de sequências do que uma substituição não conservativa, tal como a substituição de um resíduo Asp por um resíduo hidrofóbico Phe.

Para a maioria dos esforços em encontrar homologias e explorar relações evolutivas, as sequências de proteínas (derivadas tanto diretamente do sequenciamento proteico quanto do sequenciamento do DNA que codifica as proteínas) são superiores às sequências de ácidos nucleicos não gênicas (aquelas que não codificam uma proteína ou um RNA funcional). Para um ácido nucleico, com seus quatro tipos diferentes de resíduos, o alinhamento aleatório de sequências não homólogas irá em geral produzir correspondências para, no mínimo, 25% das posições. A introdução de algumas poucas lacunas pode, com frequência, aumentar a fração de resíduos correspondentes para 40% ou mais, e a probabilidade de alinhamentos aleatórios de sequências não relacionadas torna-se bastante elevada. Os 20 resíduos de aminoácidos diferentes nas proteínas reduzem muito a probabilidade de alinhamentos aleatórios não informativos desse tipo.

Os programas utilizados para gerar um alinhamento de sequências são complementados por métodos que testam a confiabilidade dos alinhamentos. Um teste computadorizado comum consiste em embaralhar a sequência de aminoácidos de uma das proteínas que estiver sendo comparada, para produzir uma sequência aleatória e então instruir o programa a alinhar a sequência embaralhada com a outra, não embaralhada. Pontuações são designadas ao novo alinhamento, e o processo de embaralhar e alinhar é repetido muitas vezes. O alinhamento original, antes de embaralhar, deve ter uma pontuação significativamente maior do que qualquer uma daquelas pontuações geradas pelos alinhamentos aleatórios; isso aumenta a confiança de que o alinhamento de sequências identificou um par de homólogos. Observe que a ausência de pontuação de alinhamento significativo não necessariamente significa que não exista relação evolutiva entre as duas proteínas. Como será visto no Capítulo 4, as semelhanças de estruturas tridimensionais revelam algumas vezes relações evolutivas nas quais a homologia de sequências foi apagada pelo tempo.

Para utilizar uma família de proteínas para explorar a evolução, os pesquisadores identificam membros da família com funções moleculares semelhantes na faixa mais ampla possível de organismos. A informação da família pode então ser utilizada para rastrear a evolução desses organismos. Ao analisar a divergência nas sequências de famílias de proteínas selecionadas, os investigadores podem separar os organismos em classes com base em suas relações evolutivas. Esta informação deve ser conciliada com exames mais clássicos da fisiologia e da bioquímica dos organismos.

Certos segmentos de uma sequência de proteínas podem ser encontrados em organismos de um grupo taxonômico, mas não em outros grupos; esses segmentos podem ser utilizados como **sequências-assinatura** para o grupo no qual elas foram encontradas. Um exemplo de uma sequência-assinatura é a inserção de 12 aminoácidos próximos à terminação amino das proteínas EF-1$\alpha$/EF-Tu em todas as arqueobactérias e eucariontes, mas não em bactérias (**Figura 3-34**). Essa assinatura particular é um dos muitos indícios bioquímicos que podem ajudar a estabelecer o relacionamento evolutivo de eucariontes e arqueobactérias. Sequências-assinatura têm sido utilizadas para estabelecer relações evolutivas entre grupos de organismos em muitos níveis taxonômicos diferentes.

Ao considerar a sequência completa de uma proteína, os pesquisadores podem atualmente construir árvores evolutivas mais elaboradas com muitas espécies em cada grupo taxonômico. A **Figura 3-35** apresenta uma dessas árvores para bactérias, com base na divergência de sequências na proteína GroEL (proteína presente em todas as bactérias que auxilia no enovelamento adequado de proteínas). A árvore pode ser aperfeiçoada utilizando as sequências de múltiplas proteínas e a complementação da informação de sequência com dados das propriedades bioquímicas e fisiológicas exclusivas de cada espécie. Há muitos métodos para gerar árvores, cada método com suas próprias vantagens e desvantagens, e diversas formas de representar as relações evolutivas resultantes. Na Figura 3-35, as extremidades livres das linhas são chamadas de "nós externos"; cada um representa uma espécie atual, que é marcada assim. Os pontos onde duas linhas se unem, os "nós internos", representam espécies ancestrais extintas. Na maior parte das representações (incluindo a Figura 3-35), os comprimentos das linhas que conectam os nós são proporcionais ao número de substituições de aminoácidos que separam uma espécie da outra. Ao rastrear duas espécies conservadas a um nó interno comum (representando o ancestral comum das duas espécies), o comprimento do ramo que conecta cada nó externo ao nó interno representa o número de substituições de aminoácidos que separam uma espécie atual de seu ancestral. A soma dos comprimentos de todos os segmentos de linhas que conectam uma espécie conservada a outras espécies conservadas com ancestral comum reflete o número de substituições que separam as duas espécies conservadas. Para determinar quanto tempo foi necessário para as várias espécies divergirem, a árvore precisa ser calibrada para compará-la com informações do registro fóssil e outras fontes.

À medida que mais informação de sequência torna-se disponível nos bancos de dados, é possível gerar árvores

**FIGURA 3-34 Uma sequência-assinatura na família de proteínas EF-1$\alpha$/EF-Tu.** A sequência-assinatura (no retângulo) é uma inserção de 12 resíduos próxima do terminal amino da sequência. Os resíduos que alinham em todas as espécies estão sombreados. Tanto as arqueias quanto os eucariontes apresentam a assinatura, embora as sequências de inserções sejam bem distintas para os dois grupos. A variação na sequência-assinatura reflete a divergência evolutiva significativa que ocorreu nesse ponto desde que ela apareceu primeiro em um ancestral comum de ambos os grupos.

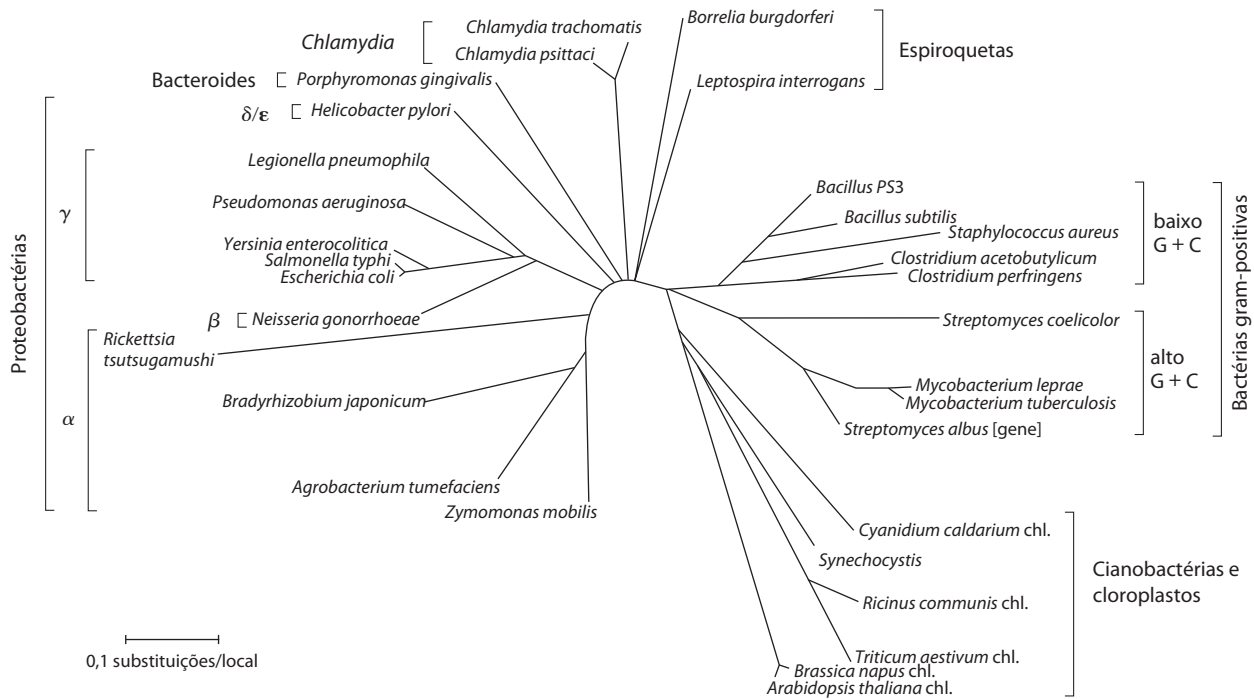



**FIGURA 3-35 Árvore evolutiva derivada de comparações entre as sequências de aminoácidos.** Árvore evolutiva bacteriana, com base na divergência de sequências observada na família de proteínas GroEL. Também estão incluídos nessa árvore (parte inferior direita) os cloroplastos de algumas espécies não bacterianas.

evolutivas com base em múltiplas proteínas, bem como aperfeiçoar essas árvores à medida que informação genômica adicional emerge de métodos de análise cada vez mais sofisticados. Todo esse trabalho tem o objetivo de criar uma árvore detalhada da vida que descreva a evolução e o parentesco de cada organismo na Terra. A história é um trabalho contínuo, é claro (**Figura 3-36**). As questões levantadas e respondidas são fundamentais para definir como os huma-

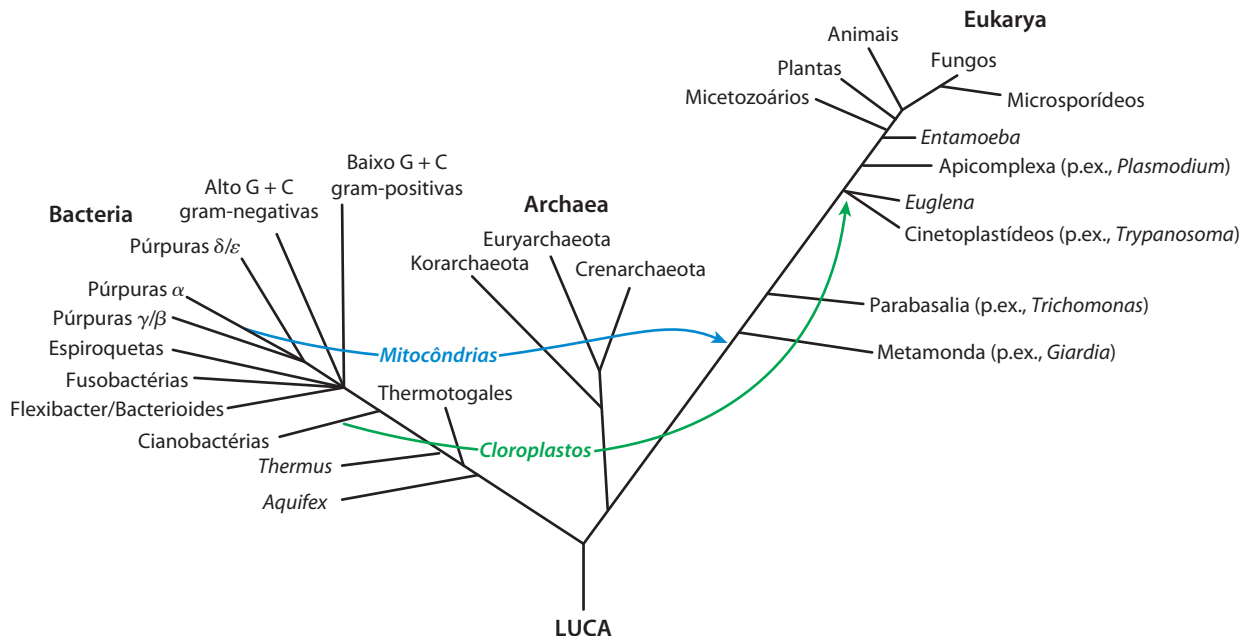



**FIGURA 3-36 Árvore de consenso da vida.** A árvore mostrada aqui baseia-se em análises de muitas sequências de proteínas e características genômicas adicionais. A árvore apresenta apenas uma fração da informação disponível, bem como apenas uma fração dos temas que ainda precisam ser solucionados. Cada grupo existente mostrado é uma história evolutiva complexa em si mesma. LUCA é o último ancestral comum universal do qual todas as outras formas de vida evoluíram. As setas azul e verde indicam a assimilação endossimbiótica de tipos específicos de bactérias por células eucariontes para se tornarem mitocôndrias e cloroplastos, respectivamente (ver Figura 1–38).

nos veem a si mesmos e ao mundo ao seu redor. O campo da evolução molecular promete estar entre as mais vibrantes fronteiras científicas do século XXI.

## RESUMO 3.4 A estrutura de proteínas: estrutura primária

- Diferenças na função de proteínas resultam de diferenças na composição e na sequência de aminoácidos. Algumas variações na sequência podem ocorrer em uma proteína particular, com pouco ou nenhum efeito em sua função.
- As sequências de aminoácidos são deduzidas pela fragmentação de polipeptídeos em peptídeos menores com reagentes conhecidos para clivar ligações peptídicas específicas; pela determinação das sequências de aminoácidos de cada fragmento pelo procedimento automatizado de degradação de Edman; então, pela ordenação dos fragmentos peptídicos pelo encontro de sobreposições de sequências entre os fragmentos gerados por diferentes reagentes. A sequência de uma proteína também pode ser deduzida a partir da sequência de nucleotídeos de seu gene correspondente no DNA ou por espectrometria de massa.
- Peptídeos e proteínas pequenas (até cerca de 100 resíduos) podem ser sintetizados quimicamente. O peptídeo é construído, um resíduo de aminoácido por vez, enquanto unido a um suporte sólido.
- Sequências proteicas são uma fonte rica de informação sobre a estrutura e a função da proteína, bem como sobre a evolução da vida na Terra. Métodos sofisticados estão sendo desenvolvidos para rastrear a evolução, analisando as lentas mudanças resultantes nas sequências de aminoácidos de proteínas homólogas.

## Termos-chave

*Termos em negrito são definidos no glossário.*



## Leituras adicionais

### Aminoácidos

**Dougherty, D.A.** (2000) Unnatural amino acids as probes of protein structure and function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 645–652.

**Kreil, G.** (1997) D-Amino acids in animal peptides. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 337–345.
Detalhes da ocorrência destes estereoisômeros incomuns de aminoácidos.

**Meister, A.** (1965) *Biochemistry of the Amino Acids*, 2nd edn, Vols 1 and 2, Academic Press, Inc., New York.
Tratamento enciclopédico das propriedades, da ocorrência e do metabolismo de aminoácidos.

### Peptídeos e proteínas

**Creighton, T.E.** (1992) *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2nd edn, W. H. Freeman and Company, New York.
Fonte geral muito útil.

### Trabalhando com proteínas

**Dunn, M.J. & Corbett, J.M.** (1996) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* **271**, 177–203.
Descrição detalhada da tecnologia.

**Kornberg, A.** (1990) Why purify enzymes? *Methods Enzymol.* **182**, 1–5.
O papel crucial dos métodos bioquímicos clássicos em uma nova era.

**Scopes, R.K.** (1994) *Protein Purification: Principles and Practice*, 3rd edn, Springer-Verlag, New York.
Boa fonte para descrições mais completas sobre os princípios subjacentes à cromatografia e outros métodos.

### Estrutura primária de proteínas e evolução

**Andersson, L., Blomberg, L., Flegel, M., Lepsa, L., Nilsson, B., & Verlander, M.** (2000) Large-scale synthesis of peptides. *Biopolymers* **55**, 227–250.
Discussão sobre as abordagens para a fabricação de peptídeos como produtos farmacêuticos.

**Dell, A. & Morris, H.R.** (2001) Glycoprotein structure determination by mass spectrometry. *Science* **291**, 2351–2356.
As glicoproteínas podem ser complexas; a espectrometria de massa é um método preferido de classificação.

**Delsuc, F., Brinkmann, H., & Philippe, H.** (2005) Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 361–375.

**Gogarten, J.P. & Townsend, J.P.** (2005) Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 679–687.

**Gygi, S.P. & Aebersold, R.** (2000) Mass spectrometry and proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 489–494.
Usos da espectrometria de massa para identificar e estudar as proteínas celulares.

**Koonin, E.V., Tatusov, R.L., & Galperin, M.Y.** (1998) Beyond complete genomes: from sequence to structure and function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 355–363.
Boa discussão sobre os possíveis usos do aumento da quantidade de informações sobre sequências de proteínas.

**Li, W.-H. & Graur, D.** (2000) *Fundamentals of Molecular Evolution*, 2nd edn, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
Texto de fácil leitura descrevendo os métodos utilizados para a análise de sequências de proteínas e de ácidos nucleicos. O Capítulo 5 fornece uma das melhores descrições disponíveis de como árvores evolutivas são construídas a partir de dados de sequências.

**Mayo, K.H.** (2000) Recent advances in the design and construction of synthetic peptides: for the love of basics or just for the technology of it. *Trends Biotechnol*. **18**, 212–217.

**Miranda, L.P. & Alewood, P.F.** (2000) Challenges for protein chemical synthesis in the 21st century: bridging genomics and proteomics. *Biopolymers* **55**, 217–226.
Este e o artigo de Mayo (acima) descrevem como produzir peptídeos e uni-los em conjuntos para tratar uma ampla faixa de problemas na bioquímica de proteínas.

**Ramisetty, S.R. & Washburn, M.P.** (2011) Unraveling the dynamics of protein interactions with quantitative mass spectrometry. *Crit. Rev. Biochem.Mol. Biol*. **46**, 216–228.

**Rokas, A., Williams, B.L., King, N., & Carroll, S.B.** (2003) Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* **425**,798–804.
Como as comparações de sequência de múltiplas proteínas podem produzir informação evolutiva precisa.

**Sanger, F.** (1988) Sequences, sequences, sequences. *Annu. Rev. Biochem*. **57**, 1–28.
Bom relato histórico do desenvolvimento de métodos de sequenciamento.

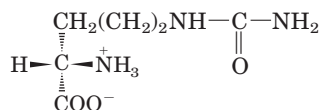
**Snel, B., Huynen, M.A., & Dutilh, B.E.** (2005) Genome trees and the nature of genome evolution. *Annu. Rev. Microbiol*. **59**, 191–209.

**Steen, H. & Mann, M.** (2004) The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **5**, 699–711.

**Zuckerkandl, E. & Pauling, L.** (1965) Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol*. **8**, 357–366.
Muitos consideram este artigo como o fundador no campo da evolução molecular.

## Problemas

**1. Configuração absoluta da citrulina.** A citrulina isolada de melancias tem a estrutura apresentada a seguir. Ela é um aminoácido D ou L? Explique.

$$\begin{array}{c} CH_2(CH_2)_2NH-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-NH_2 \\ H-C-\overset{+}{N}H_3 \\ COO^- \end{array}$$

**2. Relação entre a curva de titulação e as propriedades acidobásicas da glicina.** Uma solução de 100 mL de glicina a 0,1 M em pH 1,72 foi titulada com uma solução de 2 M de NaOH. O pH foi monitorado e os resultados foram plotados como mostrado no gráfico. Os pontos-chave na titulação são designados de I a V. Para cada uma das afirmações de (a) a (o), *identifique* o ponto-chave adequado na titulação e *justifique* sua escolha.

(a) A glicina está presente predominantemente como a espécie $^+H_3N—CH_2—COOH$.

(b) A carga final *média* da glicina é $+\frac{1}{2}$.

(c) Metade dos grupos amino está ionizado.

(d) O pH é igual ao p$K_a$ do grupo carboxila.

(e) O pH é igual ao p$K_a$ do grupo amino protonado.

(f) A glicina possui sua capacidade de tamponamento máxima.

(g) A carga final *média* da glicina é zero.

(h) O grupo carboxila foi completamente titulado (primeiro ponto de equivalência).

(i) A glicina está completamente titulada (segundo ponto de equivalência).

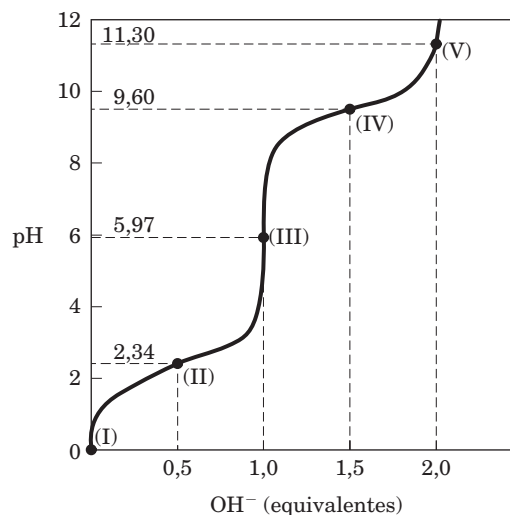
(j) A espécie predominante é $^+H_3N—CH_2—COO^-$.

(k) A carga final *média* da glicina é –1.

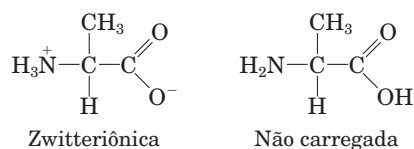
(l) A glicina está presente predominantemente como uma mistura 50:50 de $^+H_3N—CH_2—COOH$ e $^+H_3N—CH_2—COO^-$.

(m) Este é o ponto isoelétrico.

(n) Este é o final da titulação.

(o) Estas são as *piores* regiões de pH para poder de tamponamento.

**3. Quanta alanina está presente na forma da espécie completamente sem carga?** Em um pH igual ao ponto isoelétrico da alanina, a sua carga *final* é zero. Duas estruturas podem ser desenhadas que apresentam carga final igual a zero, mas a forma predominante de alanina em seu pI é zwitteriônica.

$$H_3\overset{+}{N}-\overset{CH_3}{\underset{H}{C}}-C\begin{matrix}{=O}\\{-O^-}\end{matrix} \qquad H_2N-\overset{CH_3}{\underset{H}{C}}-C\begin{matrix}{=O}\\{-OH}\end{matrix}$$

Zwitteriônica — Não carregada

(a) Por que a alanina é predominantemente zwitteriônica em vez de completamente não carregada em seu pI?

(b) Que fração de alanina está na forma completamente não carregada em seu pI? Justifique suas suposições.

**4. Estado de ionização da histidina.** Cada grupo ionizável de um aminoácido pode existir em um de dois estados, carregado ou neutro. A carga elétrica no grupo funcional é determinada pela relação entre seu p$K_a$ e o pH da solução. Essa relação é descrita pela equação de Henderson-Hasselbalch.

(a) A histidina tem três grupos funcionais ionizáveis. Escreva as equações de equilíbrio para suas três ionizações e assinale o p$K_a$ adequado para cada ionização. Desenhe a estrutura da histidina em cada estado de ionização. Qual é a carga final na molécula de histidina em cada estado de ionização?

(b) Desenhe as estruturas do estado de ionização predominante da histidina em pH 1, 4, 8 e 12. Observe que o estado de

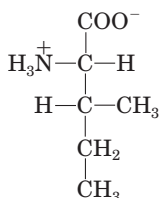
ionização pode ser aproximado tratando-se cada grupo ionizável independentemente.

(c) Qual é a carga final da histidina em pH 1, 4, 8 e 12? Para cada pH, a histidina irá migrar em direção ao ânodo (+) ou ao cátodo (–) quando colocada em um campo elétrico?

**5. Separação de aminoácidos por cromatografia de troca iônica.** Misturas de aminoácidos podem ser analisadas primeiramente pela separação da mistura em seus componentes por uma cromatografia de troca iônica. Os aminoácidos inseridos em uma resina permutadora de cátions (ver Figura 3-17a) contendo grupos sulfonados ($—SO_3^-$) fluem pela resina em velocidades diferentes em consequência de dois fatores que influenciam seu movimento: (1) atração iônica entre os resíduos sulfonados na coluna e os grupos funcionais carregados positivamente nos aminoácidos e (2) interações hidrofóbicas entre as cadeias laterais de aminoácidos e o esqueleto fortemente hidrofóbico da resina de poliestireno. Para cada par de aminoácidos listados, determine qual será eluído primeiro em uma coluna permutadora de cátions por um tampão de pH 7,0.

(a) Asp e Lys
(b) Arg e Met
(c) Glu e Val
(d) Gly e Leu
(e) Ser e Ala

**6. Nomeando os estereoisômeros de isoleucina.** A estrutura do aminoácido isoleucina é

$$\begin{array}{c} COO^- \\ | \\ H_3\overset{+}{N}—C—H \\ | \\ H—C—CH_3 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH_3 \end{array}$$

(a) Quantos centros quirais ela tem?
(b) Quantos isômeros ópticos?
(c) Desenhe fórmulas em perspectiva para todos os isômeros ópticos da isoleucina.

**7. Comparação dos valores de p$K_a$ de alanina e polialanina.** A curva de titulação da alanina mostra a ionização de dois grupos funcionais com valores de p$K_a$ de 2,34 e 9,69, correspondendo à ionização do grupo carboxila e dos grupos amino protonados, respectivamente. A titulação de di, tri e oligopeptídeos maiores de alanina também mostra a ionização de somente dois grupos funcionais, embora os valores experimentais de p$K_a$ sejam diferentes. A tendência nos valores de p$K_a$ está resumida na tabela.

| Aminoácido ou peptídeo | p$K_1$ | p$K_2$ |
|---|---|---|
| Ala | 2,34 | 9,69 |
| Ala-Ala | 3,12 | 8,30 |
| Ala-Ala-Ala | 3,39 | 8,03 |
| Ala-(Ala)$_n$–Ala, $n \geq 4$ | 3,42 | 7,94 |

(a) Desenhe a estrutura de Ala-Ala-Ala. Identifique os grupos funcionais associados a p$K_1$ e p$K_2$.

(b) Por que o valor de p$K_1$ *aumenta* com cada resíduo Ala adicional no oligopeptídeo?

(c) Por que o valor de p$K_2$ *diminui* com cada resíduo Ala adicional no oligopeptídeo?

**8. O tamanho das proteínas.** Qual é a massa molecular aproximada de uma proteína com 682 resíduos de aminoácidos em uma única cadeia polipeptídica?

**9. O número de resíduos de triptofano na albumina sérica bovina.** Uma análise quantitativa de aminoácidos revela que a albumina sérica bovina (BSA) contém 0,58% de triptofano ($M_r$ 204) por peso.

(a) Calcule a massa molecular *mínima* da BSA (i.e, presumindo-se que haja apenas um resíduo de Trp por molécula de proteína).

(b) A cromatografia de exclusão por tamanho da BSA fornece uma massa molecular estimada de BSA de 70.000. Quantos resíduos de Trp estão presentes em uma molécula de albumina sérica?

**10. Composição de subunidades de uma proteína.** Uma proteína tem uma massa molecular de 400 kDa quando medida por cromatografia de exclusão por tamanho. Quando submetida a uma eletroforese em gel na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), a proteína fornece três bandas com massas moleculares de 180, 160 e 60 kDa. Quando a eletroforese é realizada na presença de SDS e ditiotreitol, três bandas são novamente formadas, desta vez com massas moleculares de 160, 90 e 60 kDa. Determine a composição das subunidades da proteína.

**11. Carga elétrica final de peptídeos.** Um peptídeo tem a sequência

Glu-His-Trp-Ser-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly

(a) Qual é a carga final da molécula em pH 3, 8 e 11? (Utilize os valores de p$K_a$ para cadeias laterais e grupos amino e carboxila terminais como fornecidos na Tabela 3-1.)

(b) Estime o pI para este peptídeo.

**12. Ponto isoelétrico da pepsina.** Pepsina é o nome dado a uma mistura de diversas enzimas digestivas secretadas (como proteínas precursoras maiores) por glândulas no estômago. Essas glândulas também secretam ácido clorídrico, que dissolve o material particulado no alimento, permitindo à pepsina clivar de modo enzimático moléculas de proteínas individuais. A mistura resultante de alimento, HCl e enzimas digestivas é conhecida como quimo e apresenta pH próximo a 1,5. Qual pI você poderia prever para as proteínas da pepsina? Que grupos funcionais devem estar presentes para conferir esse pI à pepsina? Quais aminoácidos nas proteínas iriam contribuir com tais grupos?

**13. Ponto isoelétrico de histonas.** As histonas são proteínas encontradas no núcleo de células eucarióticas, fortemente ligadas ao DNA, com muitos grupos fosfato. O pI das histonas é muito alto, cerca de 10,8. Que resíduos de aminoácidos devem estar presentes em quantidades relativamente elevadas nas histonas? De que forma esses resíduos contribuem para a forte ligação das histonas ao DNA?

**14. Solubilidade de polipeptídeos.** Um método para separar polipeptídeos faz uso de suas diferentes solubilidades. A solubilidade de polipeptídeos grandes em água depende da polaridade relativa de seus grupos R, particularmente do número de grupos ionizáveis: quanto mais grupos ionizáveis existirem, mais solúvel será o polipeptídeo. Qual, de cada par de polipeptídeos a seguir, é mais solúvel no pH indicado?

(a) $(Gly)_{20}$ ou $(Glu)_{20}$ em pH 7,0
(b) $(Lys\text{-}Ala)_3$ ou $(Phe\text{-}Met)_3$ em pH 7,0
(c) $(Ala\text{-}Ser\text{-}Gly)_5$ ou $(Asn\text{-}Ser\text{-}His)_5$ em pH 6,0
(d) $(Ala\text{-}Asp\text{-}Gly)_5$ ou $(Asn\text{-}Ser\text{-}His)_5$ em pH 3,0

**15. Purificação de uma enzima.** Um bioquímico descobre e purifica uma nova enzima, gerando a tabela de purificação a seguir.

| Procedimento | Proteína total (mg) | Atividade (unidades) |
|---|---|---|
| 1. Extrato bruto | 20.000 | 4.000.000 |
| 2. Precipitação (sal) | 5.000 | 3.000.000 |
| 3. Precipitação (pH) | 4.000 | 1.000.000 |
| 4. Cromatografia de troca iônica | 200 | 800.000 |
| 5. Cromatografia de afinidade | 50 | 750.000 |
| 6. Cromatografia de exclusão por tamanho | 45 | 675.000 |

(a) A partir da informação contida na tabela, calcule a atividade específica da enzima após cada procedimento de purificação.

(b) Qual dos procedimentos de purificação utilizados para essa enzima é mais eficaz (i.e, fornece o maior aumento relativo em pureza)?

(c) Qual dos procedimentos de purificação é menos efetivo?

(d) Há alguma indicação, com base nos resultados apresentados na tabela, de que a enzima está pura após a etapa 6? O que mais poderia ser feito para estimar a pureza da preparação da enzima?

**16. Diálise.** Uma proteína purificada está em um tampão Hepes (*N*-(2-hidróxi-etil)piperazina-*N′*-(ácido 2-etanossulfônico)) em pH 7 com 500 mM de NaCl. Uma amostra (1 mL) da solução de proteína é inserida em um tubo feito de membrana de diálise e dialisado contra 1 L do mesmo tampão Hepes com 0 mM de NaCl. Moléculas pequenas e íons (como $Na^+$, $Cl^-$ e Hepes) podem se difundir através da membrana de diálise, mas a proteína não.

(a) Uma vez que a diálise alcança o equilíbrio, qual é a concentração de NaCl na amostra de proteína? Assuma que nenhuma mudança de volume ocorra na amostra durante a diálise.

(b) Se a amostra de 1 mL original fosse dialisada duas vezes, sucessivamente, contra 100 mL do mesmo tampão Hepes com 0 mM NaCl, qual seria a concentração final de NaCl na amostra?

**17. Purificação de peptídeos.** Em pH 7,0, em que ordem os três peptídeos a seguir seriam eluídos em uma coluna preenchida com um polímero permutador de cátions? Suas composições em aminoácidos são:

Peptídeo A: Ala 10%, Glu 5%, Ser 5%, Leu 10%, Arg 10%, His 5%, Ile 10%, Phe 5%, Tyr 5%, Lys 10%, Gly 10%, Pro 5% e Trp 10%.

Peptídeo B: Ala 5%, Val 5%, Gly 10%, Asp 5%, Leu 5%, Arg 5%, Ile 5%, Phe 5%, Tyr 5%, Lys 5%, Trp 5%, Ser 5%, Thr 5%, Glu 5%, Asn 5%, Pro 10%, Met 5% e Cys 5%.

Peptídeo C: Ala 10%, Glu 10%, Gly 5%, Leu 5%, Asp 10%, Arg 5%, Met 5%, Cys 5%, Tyr 5%, Phe 5%, His 5%, Val 5%, Pro 5%, Thr 5%, Ser 5%, Asn 5% e Gln 5%.

**18. Determinação da sequência do peptídeo cerebral leucina encefalina.** Um grupo de peptídeos que influencia a transmissão nervosa em certas partes do cérebro foi isolado de tecido cerebral normal. Esses peptídeos são conhecidos como opioides porque se ligam a receptores específicos que também se ligam a fármacos opiáceos, como a morfina e a naloxona. Os opioides, portanto, mimetizam algumas propriedades dos fármacos opiáceos. Alguns pesquisadores consideram que esses peptídeos sejam os analgésicos próprios do cérebro. Utilizando as informações a seguir, determine a sequência de aminoácidos do opioide leucina encefalina. Explique como sua estrutura é consistente com cada uma das informações fornecidas.

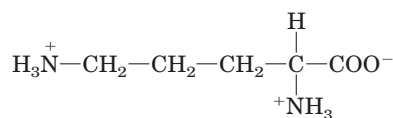
(a) A hidrólise completa por 6 M de HCl a 110°C, seguida pela análise de aminoácidos, indicou a presença de Gly, Leu, Phe e Tyr em uma razão molar de 2:1:1:1.

(b) O tratamento do peptídeo com 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno seguido pela hidrólise completa e cromatografia indicou a presença de um derivado 2,4-dinitrofenila da tirosina. Nenhuma tirosina livre foi encontrada.

(c) A digestão completa do peptídeo com quimotripsina seguida por cromatografia forneceu tirosina e leucina livres mais um tripeptídeo contendo Phe e Gly em uma razão de 1:2.

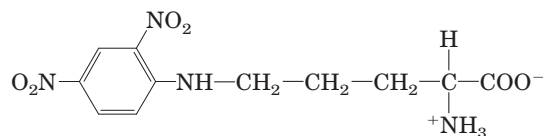
**19. Estrutura do peptídeo antibiótico de *Bacillus brevis*.** Extratos da bactéria *Bacillus brevis* contêm um peptídeo com propriedades antibióticas. Esse peptídeo forma complexos com íons metálicos e parece interromper o transporte iônico através de membranas celulares de outras espécies bacterianas, matando-as. A estrutura do peptídeo foi determinada a partir das seguintes observações:

(a) A hidrólise ácida completa do peptídeo seguida de análise de aminoácidos produziu quantidades equimolares de Leu, Orn, Phe, Pro e Val. Orn é ornitina, um aminoácido que não está presente em proteínas, mas aparece em alguns peptídeos. Ela tem a seguinte estrutura:

$$H_3\overset{+}{N}-CH_2-CH_2-CH_2-\underset{^+NH_3}{\overset{H}{\underset{|}{\overset{|}{C}}}}-COO^-$$

(b) A massa molecular do peptídeo foi estimada em aproximadamente 1.200.

(c) O peptídeo não sofreu hidrólise quando tratado com a enzima carboxipeptidase. Essa enzima catalisa a hidrólise do resíduo carboxiterminal de um polipeptídeo a menos que o resíduo seja Pro ou, por alguma razão, não contenha um grupo carboxila livre.

(d) O tratamento do peptídeo intacto com 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno, seguido por hidrólise completa e cromatografia, produziu apenas aminoácidos livres e o seguinte derivado:

$$O_2N-C_6H_3(NO_2)-NH-CH_2-CH_2-CH_2-\underset{^+NH_3}{\overset{H}{\underset{|}{\overset{|}{C}}}}-COO^-$$

Dica: o derivado de 2,4-dinitrofenila envolve o grupo amino de uma cadeia lateral em vez de um grupo α-amino.

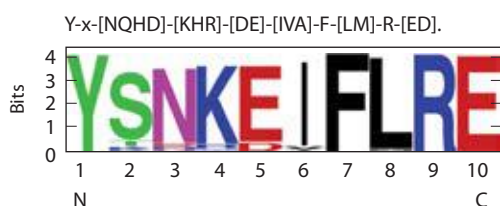
(e) A hidrólise parcial do peptídeo seguida por separação cromatográfica e análise de sequência produziu os seguintes di e tripeptídeos (o aminoácido aminoterminal está sempre à esquerda):

Leu-Phe   Phe-Pro   Orn-Leu   Val-Orn

Val-Orn-Leu   Phe-Pro-Val   Pro-Val-Orn

A partir das informações fornecidas acima, deduza a sequência de aminoácidos do peptídeo antibiótico. Mostre seu raciocínio. Quando você tiver chegado a uma estrutura, demonstre que ela é consistente com *cada* observação experimental.

**20. Eficiência no sequenciamento de peptídeos** Um peptídeo com a estrutura primária Lys-Arg-Pro-Leu-Ile-Asp--Gly-Ala é sequenciado pelo procedimento de Edman. Se cada ciclo de Edman tiver uma eficiência de 96%, que porcentagem dos aminoácidos liberados no quarto ciclo será leucina? Faça o cálculo uma segunda vez, mas presuma uma eficiência de 99% para cada ciclo.

**21. Comparação de sequências** Proteínas denominadas chaperonas moleculares (descritas no Capítulo 4) auxiliam no processo de enovelamento proteico. Uma classe de chaperonas encontrada em organismos desde bactérias a mamíferos é a proteína de choque térmico 90 (Hsp90). Todas as chaperonas Hsp90 contêm uma "sequência-assinatura" de 10 aminoácidos que permite uma identificação rápida dessas proteínas em bancos de dados de sequências. Duas representações dessa sequência-assinatura são apresentadas a seguir.

(a) Nesta sequência, que resíduos de aminoácidos não variam (conservados ao longo de todas as espécies)?

(b) A qual(is) posição(ões) estão limitados aqueles aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente? Para cada posição, qual aminoácido é mais comumente encontrado?

(c) Em quais posições as substituições estão restritas a aminoácidos com cadeias laterais carregadas negativamente? Para cada posição, qual aminoácido predomina?

(d) Há uma posição que pode ser qualquer aminoácido, embora um aminoácido apareça com muito mais frequência do que qualquer outro. Que posição é esta, e qual aminoácido aparece com mais frequência?

**22. Métodos cromatográficos** Três aminoácidos, cujas sequências são apresentadas a seguir, utilizando o código de uma letra para seus aminoácidos, estão presentes em uma mistura:

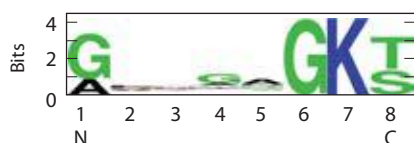
1. ATKNRASCLVPKHGALMFWRHKQLVSDPILQKRQHIL-VCRNAAG
2. GPYFGDEPLDVHDEPEEG
3. PHLLSAWKGMEGVGKSQSFAALIVILA

Qual deles migraria mais lentamente durante a cromatografia através de:

(a) uma resina de troca iônica; grânulos revestidos com grupos carregados positivamente?

(b) uma resina de troca iônica; grânulos revestidos com grupos carregados negativamente?

(c) uma coluna de exclusão por tamanho (filtração em gel) projetada para separar peptídeos pequenos como esses?

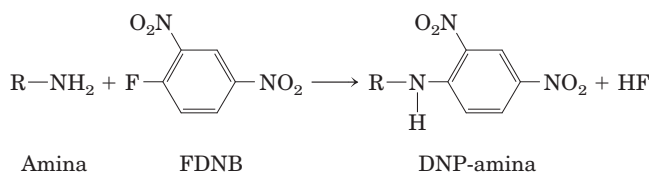
(d) Quais os peptídeos que contêm os motivos de ligação ao ATP mostrados na sequência logo a seguir?

## Problemas de análise de dados

**23. Determinação da sequência de aminoácidos da insulina** A Figura 3-24 mostra a sequência de aminoácidos da insulina bovina. Essa estrutura foi determinada por Frederick Sanger e colaboradores. A maior parte desse trabalho está descrita em uma série de artigos publicados no *Biochemical Journal* de 1945 a 1955.

Quando Sanger e seus colaboradores iniciaram seu trabalho em 1945, sabia-se que a insulina era uma proteína pequena consistindo em duas ou quatro cadeias polipeptídicas ligadas por ligações dissulfeto. Sanger e seus colaboradores desenvolveram alguns poucos métodos simples para o estudo de sequências de proteínas.

*Tratamento com FDNB*. O FDNB (1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno) reage com grupos amino livres (exceto amida ou guanidina) em proteínas para produzir derivados dinitrofenil de aminoácidos:

$$R{-}NH_2 + F{-}C_6H_3(O_2N)(NO_2) \longrightarrow R{-}NH{-}C_6H_3(O_2N)(NO_2) + HF$$

Amina FDNB DNP-amina

*Hidrólise ácida*. Ferver uma proteína na presença de HCl a 10% por várias horas hidrolisa todas as suas ligações peptídicas e amídicas. Tratamentos curtos produzem polipeptídeos curtos; quanto mais longo o tratamento, mais completa é a quebra da proteína em seus aminoácidos.

*Oxidação de cisteínas*. O tratamento de uma proteína com ácido perfórmico clivou todas as ligações dissulfeto e converteu todos os resíduos Cys a resíduos de ácido cisteico (ver Figura 3-28).

*Cromatografia em papel*. Esta versão mais primitiva da cromatografia em camada delgada (ver Figura 10-25) separava compostos com base em suas propriedades químicas, permitindo a identificação de aminoácidos isolados e, em alguns casos, dipeptídeos. A cromatografia em camada delgada também separa peptídeos maiores.

Como relatado em seu primeiro artigo (1945), Sanger promoveu a reação da insulina com o FDNB e hidrolisou a proteína resultante. Ele encontrou muitos aminoácidos livres, mas apenas três aminoácidos-DNP: $\alpha$-DNP-glicina (o grupo DNP ligado ao grupo $\alpha$-amino); $\alpha$-DNP-fenilalanina; e $\varepsilon$-DNP-lisina (DNP ligado ao grupo $\varepsilon$-amino). Sanger interpretou esses resultados indicando que a insulina tinha duas cadeias proteicas: uma com Gly em sua extremidade aminoterminal e outra com Phe em sua extremidade aminoterminal. Uma das duas cadeias também continha um resíduo Lys, mas não na extremidade aminoterminal. Ele nomeou a cadeia iniciada com o resíduo Gly de "A" e a cadeia iniciada com Phe de "B".

(a) Explique como os resultados de Sanger apoiam suas conclusões.

(b) Esses resultados são consistentes com a estrutura conhecida da insulina bovina (ver Figura 3-24)?

Em um artigo posterior (1949), Sanger descreveu como ele utilizou essas técnicas para determinar os primeiros poucos aminoácidos (extremidade aminoterminal) de cada cadeia de insulina. Para analisar a cadeia B, por exemplo, ele seguiu as seguintes etapas:

1. Oxidou a insulina para separar as cadeias A e B.
2. Preparou uma amostra de cadeia B pura por cromatografia em papel.
3. Reagiu a cadeia B com FDNB.
4. Submeteu a proteína à hidrólise ácida branda, de modo a produzir peptídeos pequenos.
5. Separou os peptídeos-DNP dos peptídeos que não continham grupos DNP.
6. Isolou quatro dos peptídeos-DNP, os quais foram nomeados B1 a B4.
7. Submeteu à hidrólise intensa cada peptídeo-DNP para obter os aminoácidos livres.
8. Identificou os aminoácidos em cada peptídeo por cromatografia em papel.

Os resultados foram os seguintes:

B1: apenas $\alpha$-DNP-fenilalanina

B2: $\alpha$-DNP-fenilalanina; valina

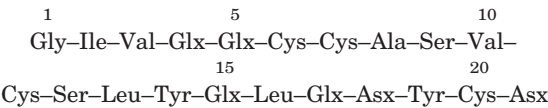
B3: ácido aspártico; $\alpha$-DNP-fenilalanina; valina

B4: ácido aspártico; ácido glutâmico; $\alpha$-DNP-fenilalanina; valina

(c) Com base nesses dados, quais são os primeiros quatro aminoácidos (aminoterminais) da cadeia B? Explique seu raciocínio.

(d) Esse resultado coincide com a sequência conhecida da insulina bovina (ver Figura 3-24)? Explique quaisquer discrepâncias.

Sanger e colaboradores utilizaram esses e outros métodos relacionados para determinar a sequência completa das cadeias A e B. Suas sequências para a cadeia A foram as seguintes (aminoterminal à esquerda):

1 5 10
Gly–Ile–Val–Glx–Glx–Cys–Cys–Ala–Ser–Val–
15 20
Cys–Ser–Leu–Tyr–Glx–Leu–Glx–Asx–Tyr–Cys–Asx

Como a hidrólise ácida converteu todo Asn a Asp e todo Gln a Glu, esses resíduos tiveram de ser denominados Asx e Glx, respectivamente (a identidade exata no peptídeo desconhecida). Sanger resolveu esse problema utilizando enzimas proteases que clivam ligações peptídicas, mas não as ligações amídicas nos resíduos Asn e Gln, para preparar peptídeos curtos. Ele então determinou o número de grupos amida presentes em cada peptídeo medindo a liberação de $NH_4^+$ quando o peptídeo era hidrolisado em ácido. Alguns dos resultados obtidos para a cadeia A são mostrados a seguir. Os peptídeos podem não ter sido completamente puros, de modo que os números foram aproximados – mas bons o bastante para os propósitos de Sanger.

| Nome do peptídeo | Sequência peptídica | Número de grupos amida no peptídeo |
|---|---|---|
| Ac1 | Cys-Asx | 0,7 |
| Ap15 | Tyr-Glx-Leu | 0,98 |
| Ap14 | Tyr-Glx-Leu-Glx | 1,06 |
| Ap3 | Asx-Tyr-Cys-Asx | 2,10 |
| Ap1 | Glx-Asx-Tyr-Cys-Asx | 1,94 |
| Ap5pa1 | Gly-Ile-Val-Glx | 0,15 |
| Ap5 | Gly-Ile-Val-Glx-Glx-Cys-Cys-Ala-Ser-Val-Cys-Ser-Leu | 1,16 |

(e) Com base nesses dados, determine a sequência de aminoácidos da cadeia A. Explique como você obteve sua resposta e a compare com a Figura 3-24.

## Referências

**Sanger, F.** (1945) The free amino groups of insulin. *Biochem. J.* **39**, 507–515.

**Sanger, F.** (1949) The terminal peptides of insulin. *Biochem. J.* **45**, 563–574.

4

# Estrutura Tridimensional de Proteínas



As proteínas são moléculas grandes. O esqueleto covalente de uma proteína clássica é formado por centenas de ligações simples. Como é possível a livre rotação entre várias dessas ligações, a proteína consegue, em princípio, assumir um número de conformações praticamente incontáveis. Entretanto, cada proteína tem uma função química e uma estrutura específica, sugerindo que cada uma delas tenha uma estrutura tridimensional única (**Figura 4-1**). Quão estável é essa estrutura, quais fatores guiam sua formação e o que a mantém unida? No final de 1920, várias proteínas foram cristalizadas, incluindo a hemoglobina ($M_r$ 64.500) e a enzima urease ($M_r$ 483.000). Como, geralmente, o arranjo ordenado das moléculas em um cristal pode ocorrer somente se as unidades moleculares forem idênticas, a descoberta de que várias proteínas poderiam ser cristalizadas era a evidência de que até mesmo proteínas muito grandes são entidades químicas separadas com estruturas únicas. Essa conclusão revolucionou o pensamento sobre as proteínas e suas funções, mas o conhecimento que ela gerou foi incompleto. A estrutura proteica é sempre maleável, algumas vezes de forma surpreendente. Mudanças na estrutura podem ser tão importantes para a função da proteína quanto a estrutura por si só.

**FIGURA 4-1 Estrutura da enzima quimotripsina, uma proteína globular.** A molécula de glicina (em cinza) é representada para comparação de tamanho. As estruturas tridimensionais conhecidas das proteínas estão arquivadas no *Protein Data Bank* – PDB (ver Quadro 4-4). A imagem mostrada aqui foi elaborada utilizando os dados do PDB ID 6GCH.

Neste capítulo, será examinada a estrutura das proteínas. São enfatizados seis temas. Primeiro, a estrutura tridimensional, ou seja, as estruturas de uma proteína são determinadas por sua sequência de aminoácidos. Segundo, a função de uma proteína típica depende de sua estrutura. Terceiro, a maior parte das proteínas isoladas existem em um ou em um pequeno número de formas estruturalmente estáveis. Quarto, as forças mais importantes de estabilização das estruturas específicas de uma dada proteína são as interações não covalentes. Quinto, dentre desse enorme número de estruturas únicas das proteínas, podem ser reconhecidos alguns padrões estruturais comuns, que ajudam a organizar o entendimento sobre a arquitetura das proteínas. Sexto, as estruturas proteicas não são estáticas. Todas as proteínas passam por mudanças na conformação variando desde sutis até bastante significativas. Partes de muitas proteínas possuem estruturas não discerníveis. Para algumas proteínas, a ausência de estrutura definida é fundamental para sua função.

## 4.1 Visão geral sobre a estrutura das proteínas

O arranjo espacial dos átomos em uma proteína ou qualquer parte da proteína é chamado de **conformação**. As conformações possíveis de uma proteína ou de qualquer segmento proteico incluem qualquer estado estrutural que ela possa assumir sem a quebra de suas ligações covalentes. Uma mudança conformacional pode ocorrer, por exemplo, pela rotação sobre as ligações simples. Das várias conformações teoricamente possíveis para uma proteína com centenas de ligações simples, uma ou (mais comumente) poucas predominam em condições biológicas. A necessidade de múltiplas conformações estáveis reflete as mudanças que devem ocorrer na proteína quando ela se liga a outras moléculas ou catalisa reações. As conformações que existem em determinadas condições são, normalmente, aquelas termodinamicamente mais estáveis – isto é, aquelas com energia livre de Gibbs ($G$) menores. Proteínas dobradas, em qualquer uma de suas conformações funcionais, são chamadas de proteínas **nativas**.

Para a grande maioria das proteínas, uma estrutura em particular ou um pequeno grupo de estruturas é crucial para a função. No entanto, em muitos casos, partes das proteínas carecem de estruturas perceptíveis. Esses seg-

mentos proteicos são intrinsecamente desordenados. Em alguns casos, proteínas inteiras são intrinsecamente desordenadas, e ainda assim funcionais.

Quais os princípios que determinam as conformações mais estáveis de uma proteína típica? Uma compreensão da conformação de proteínas pode ser construída, passo a passo, a partir da discussão sobre estrutura primária no Capítulo 3, passando pela consideração das estruturas secundárias, terciárias e quaternárias. A essa abordagem clássica, é preciso acrescentar a ênfase mais recente dada aos padrões comuns e classificáveis de enovelamento, variavelmente chamados de estruturas supersecundárias, enovelamentos ou motivos, que estabelecem um importante contexto organizacional para esse esforço complexo. A título de introdução, serão apresentados alguns princípios básicos.

## A conformação de uma proteína é estabilizada por interações fracas

No contexto da estrutura de proteínas, o termo **estabilidade** pode ser definido como a tendência em manter a conformação nativa. Proteínas nativas são apenas marginalmente estáveis: o $\Delta G$ que separa os estados dobrados e não dobrados em proteínas comuns, sob condições fisiológicas, está na faixa de apenas 20 a 65 kJ/mol. Uma dada cadeia polipeptídica pode, teoricamente, assumir inúmeras conformações e, como resultado, o estado não dobrado de uma proteína é caracterizado por um alto grau de entropia conformacional. Essa entropia, junto com as interações de ligações de hidrogênio dos diversos grupos da cadeia polipeptídica com o solvente (água), tendem a manter o estado não dobrado. As interações químicas que contrabalançam esses efeitos e estabilizam a conformação nativa incluem ligações dissulfeto (covalentes) e interações fracas (não covalentes), descritas no Capítulo 2: ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas e iônicas.

Várias proteínas não têm ligações dissulfeto. O ambiente dentro da maioria das células é altamente redutor devido à alta concentração de agentes redutores, como a glutationa, e a maior parte das sulfidrilas permanece então no estado reduzido. Fora da célula, o ambiente é frequentemente mais oxidante e a formação de dissulfeto é mais provável de ocorrer. Em eucariotos, as ligações dissulfeto são encontradas, principalmente, em proteínas secretadas, extracelulares (p. ex., o hormônio insulina). As ligações dissulfeto também são incomuns em proteínas de bactérias. Entretanto, bactérias termofílicas, assim como arquibactérias, geralmente apresentam várias proteínas com ligações dissulfeto, que as estabilizam. Presumivelmente, isso é uma adaptação para a vida a altas temperaturas.

Para todas as proteínas de todos os organismos, as interações fracas são especialmente importantes para o enovelamento das cadeias polipeptídicas em suas estruturas secundárias e terciárias. A associação de múltiplos polipeptídeos para formar estruturas quaternárias também tem como base estas interações fracas.

Aproximadamente 200 a 460 kJ/mol são necessários para quebrar uma ligação covalente simples, enquanto interações fracas podem ser rompidas com apenas 0,4 a 30 kJ/mol. Individualmente, uma ligação covalente, como as ligações dissulfeto conectando regiões distintas de uma única cadeia polipeptídica, é claramente muito mais forte que uma interação fraca. Entretanto, por serem muito numerosas, são as interações fracas que predominam como forças estabilizadoras da estrutura proteica. Em geral, a conformação proteica de energia livre mais baixa (i.e., de conformação mais estável) é aquela com o número máximo de interações fracas.

A estabilidade de uma proteína não é simplesmente o somatório das energias livres de formação das diversas interações fracas internas. Para cada ligação de hidrogênio formada em uma proteína durante seu enovelamento, uma ligação de hidrogênio (de força equivalente) entre o mesmo grupo e a água é quebrada. A estabilidade resultante da contribuição de uma dada ligação de hidrogênio, ou a *diferença* de energia livre entre os estados dobrado e não dobrado, deve ser próxima de zero. Interações iônicas podem ser tanto estabilizadoras, quanto desestabilizadoras. Portanto, é preciso olhar em outros lugares para entender por que uma determinada conformação nativa é favorável.

A partir de um exame cuidadoso da contribuição das interações fracas na estabilidade das proteínas, fica evidente que as **interações hidrofóbicas** geralmente predominam. A água pura contém moléculas de $H_2O$ formando uma rede de ligações de hidrogênio. Nenhuma outra molécula tem o potencial de ligação de hidrogênio da água, e a presença de outras moléculas na solução aquosa rompe estas ligações de hidrogênio. Quando a água envolve uma molécula hidrofóbica, o arranjo ótimo de ligação de hidrogênio resulta em uma camada altamente estruturada, ou **camada de solvatação**, de água em torno da molécula (ver Figura 2-7). O aumento da ordem das moléculas de água na camada de solvatação está correlacionado com uma redução desfavorável na entropia da água. Entretanto, quando grupos apolares se agrupam, o tamanho da camada de solvatação diminui, porque cada grupo não mais expõe toda sua superfície à solução. O resultado é um aumento favorável de entropia. Como descrito no Capítulo 2, esse aumento de entropia é a principal força termodinâmica que rege a associação de grupos hidrofóbicos em solução aquosa. Cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos tendem a se agrupar no interior das proteínas, longe da água (pense em uma gota de óleo na água). A sequência de aminoácidos da maioria das proteínas, assim, apresenta um conteúdo significativo de cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos (especialmente Leu, Ile, Val, Phe e Trp). Posicionam-se de forma a se aglomerar quando a proteína é dobrada, formando um núcleo hidrofóbico da proteína.

Sob condições fisiológicas, a formação de ligações de hidrogênio em uma proteína é em grande parte dirigida pelo mesmo efeito entrópico. Grupos polares normalmente podem formar ligações de hidrogênio com a água, e, por isso, são solúveis em água. Entretanto, o número de ligações de hidrogênio por unidade de massa normalmente é maior para a água pura do que para qualquer outro líquido ou solução, e há limites de solubilidade até para as moléculas mais polares, pois sua presença causa uma diminuição no número total de ligações de hidrogênio por unidade de massa. Portanto, uma camada de solvatação, até certo ponto, também se forma em torno de moléculas polares. Apesar

de a energia de formação de uma ligação de hidrogênio intramolecular entre dois grupos polares em uma macromolécula ser em grande parte anulada pela eliminação de tais interações entre esses grupos polares e a água, a liberação da água estruturada, na forma de interações intramoleculares, garante a força entrópica que leva ao enovelamento. A maior parte da variação de energia livre na forma de interações fracas dentro da proteína é assim originária do aumento de entropia na solução aquosa circundante, resultante do confinamento das superfícies hidrofóbicas. Isso mais do que contrabalança a grande perda de entropia conformacional, pois o polipeptídeo é limitado à sua conformação dobrada.

As interações hidrofóbicas são importantes na estabilização da conformação: o interior de uma proteína geralmente é um núcleo altamente empacotado de cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos. Também é importante que cada grupo polar ou carregado no interior da proteína tenha um par adequado para fazer ligação de hidrogênio ou interação iônica. Uma ligação de hidrogênio parece contribuir pouco para a estabilidade de uma estrutura nativa, mas a presença de grupos que fazem ligações de hidrogênio sem par no núcleo hidrofóbico de uma proteína pode ser tão *desestabilizadora* que conformações contendo esse grupo são termodinamicamente insustentáveis. A variação favorável de energia livre resultante da combinação de vários desses grupos com parceiros na solução que os circunda pode ser maior do que a diferença de energia livre entre os estados dobrados e não dobrados. Além disso, ligações de hidrogênio entre grupos em uma proteína se formam cooperativamente (a formação de uma torna mais provável a formação da próxima) em estruturas secundárias repetidas que otimizam as ligações de hidrogênio, como descrito a seguir. Dessa forma, as ligações de hidrogênio normalmente têm um importante papel na condução do processo de enovelamento de proteínas.

A interação entre grupos carregados com cargas opostas, que formam um par iônico ou uma ponte salina, pode exercer tanto um efeito estabilizante quanto desestabilizante na estrutura da proteína. Como no caso das ligações de hidrogênio, cadeias laterais de aminoácidos carregados interagem com a água e com sais quando a proteína não está dobrada, e a perda dessas interações deve ser considerada quando se avalia o efeito da ponte salina na estabilidade geral de uma proteína dobrada. Entretanto, a força de uma ponte salina aumenta à medida que se desloca para um ambiente com constante dielétrica mais baixa, $\varepsilon$ (p. 50): do solvente aquoso polar ($\varepsilon$ próximo a 80) para o interior apolar da proteína ($\varepsilon$ próximo a 4). Pontes salinas, especialmente aquelas parcial ou totalmente internas na proteína, podem, assim, proporcionar uma estabilização significativa da estrutura de uma proteína. Essa tendência explica o aumento da ocorrência de pontes salinas internas nas proteínas de organismos termofílicos. Interações iônicas também limitam a flexibilidade estrutural e conferem uma singularidade a uma determinada estrutura proteica que as interações hidrofóbicas não específicas não conseguem proporcionar.

No ambiente atômico altamente empacotado de uma proteína, mais um tipo de interação fraca pode ter um efeito significativo – as interações de van der Waals (p. 54). As interações de van der Waals são interações dipolo-dipolo envolvendo os dipolos elétricos permanentes de grupos, tal como as carbonilas, dipolos transitórios derivados das flutuações das nuvens de elétrons em torno de qualquer átomo, e dipolos induzidos pela interação de um átomo com outro que contém um dipolo permanente ou transitório. À medida que os átomos interagem um com o outro, essas interações dipolo-dipolo fornecem uma força intermolecular atrativa que opera apenas sobre uma distância intermolecular limite (0,3 a 0,6 nm). As interações de van der Waals são fracas e individualmente contribuem pouco para a estabilidade da proteína em geral. No entanto, em uma proteína bem empacotada ou na interação de uma proteína com outra proteína ou com outra molécula em uma superfície complementar, o número de tais interações pode ser substancial.

A maioria dos padrões estruturais resumidos neste capítulo reflete duas regras simples: (1) resíduos hidrofóbicos estão basicamente escondidos no interior da proteína, longe da água, e (2) o número de ligações de hidrogênio dentro da proteína é maximizado, reduzindo assim o número de grupos capazes de fazer ligações de hidrogênio e grupos iônicos que não estão adequadamente pareados. As proteínas de membrana (examinadas no Capítulo 11) e proteínas intrinsecamente desordenadas ou que têm segmentos intrinsecamente desordenados seguem regras diferentes. Isso reflete suas funções ou ambientes específicos, mas as interações fracas ainda são elementos estruturais importantes. Por exemplo, proteínas solúveis, mas com segmentos intrinsecamente desordenados, são ricas em cadeias laterais de aminoácidos carregados (especialmente Arg, Lys e Glu) ou pequenos (Gly e Ala), gerando pouca ou nenhuma oportunidade para formação do núcleo hidrofóbico estável.

## A ligação peptídica é rígida e planar

**Arquitetura das proteínas – Estrutura primária** As ligações covalentes também impõem importantes restrições na conformação de um polipeptídeo. No final de 1930, Linus Pauling e Robert Corey iniciaram uma série de estudos que lançaram os fundamentos do entendimento atual sobre estrutura de proteínas. Eles começaram com uma cuidadosa análise da ligação peptídica.

Os carbonos $\alpha$ de resíduos adjacentes de aminoácidos são separados por três ligações covalentes, arranjados na

Linus Pauling, 1901-1994

Robert Corey, 1897-1971

forma $C_\alpha$—C—N—$C_\alpha$. Estudos de difração de raios X de cristais de aminoácidos e de dipeptídeos e tripeptídeos simples mostraram que a ligação peptídica C—N é de alguma forma mais curta que a ligação C—N de uma amina simples, e que os átomos associados à ligação peptídica são planares. Isso indicava a ressonância ou o compartilhamento parcial de dois pares de elétrons entre o oxigênio carbonílico e o nitrogênio da amida (**Figura 4-2a**). O oxigênio tem uma carga parcial negativa e o hidrogênio ligado ao nitrogênio tem uma carga líquida parcial positiva, formando um pequeno dipolo elétrico. Os seis átomos do **grupo peptídico** estão em um único plano, com o átomo de oxigênio do grupo carbonílico *trans* ao átomo de hidrogênio do nitrogênio da amida. A partir destas observações, Pauling e Corey concluíram que as ligações peptídicas C—N não podem girar livremente, devido ao seu caráter parcial de ligação dupla. A rotação é permitida ao redor das ligações N—$C_\alpha$ e $C_\alpha$—C. O esqueleto de uma cadeia polipeptídica pode, então, ser descrito como uma série de planos rígidos, com planos consecutivos compartilhando um ponto comum de rotação no $C_\alpha$ (Figura 4-2b). As ligações peptídicas rígidas limitam a variação de conformações possíveis para uma cadeia polipeptídica.

A conformação da ligação peptídica é definida por três ângulos diedros (também conhecidos como ângulos de torção), chamados de $\phi$ (phi), $\psi$ (psi) e $\omega$ (ômega), que refletem a rotação sobre cada uma das três ligações que se repetem no esqueleto peptídico. Um ângulo diedro é o ângulo da intersecção de dois planos. No caso dos peptídeos, os planos são definidos pelos vetores das ligações do esqueleto peptídico. Dois vetores de ligações sucessivas descrevem um plano. Três vetores de ligações sucessivas descrevem dois planos (o vetor da ligação central é comum a ambos; Figura 4-2c), e o ângulo entre esses dois planos é medido para descrever a conformação da proteína.

**CONVENÇÃO-CHAVE:** Os ângulos diedros importantes para um peptídeo são definidos por três vetores das ligações que conectam quatro átomos consecutivos da cadeia principal (esqueleto peptídico) (Figura 4-2c): $\phi$ envolve as ligações C—N—$C_\alpha$—C (com a rotação ocorrendo entre a ligação N—$C_\alpha$), e $\psi$ envolve as ligações N—$C_\alpha$—C—N. Ambos, $\phi$ e $\psi$, são definidos como $\pm 180°$ quando o polipeptídeo está completamente estendido e todos os grupos peptídicos estão no mesmo plano (Figura 4-2d). Quando se observa ao longo do vetor da ligação central, na direção da flecha do

(a)

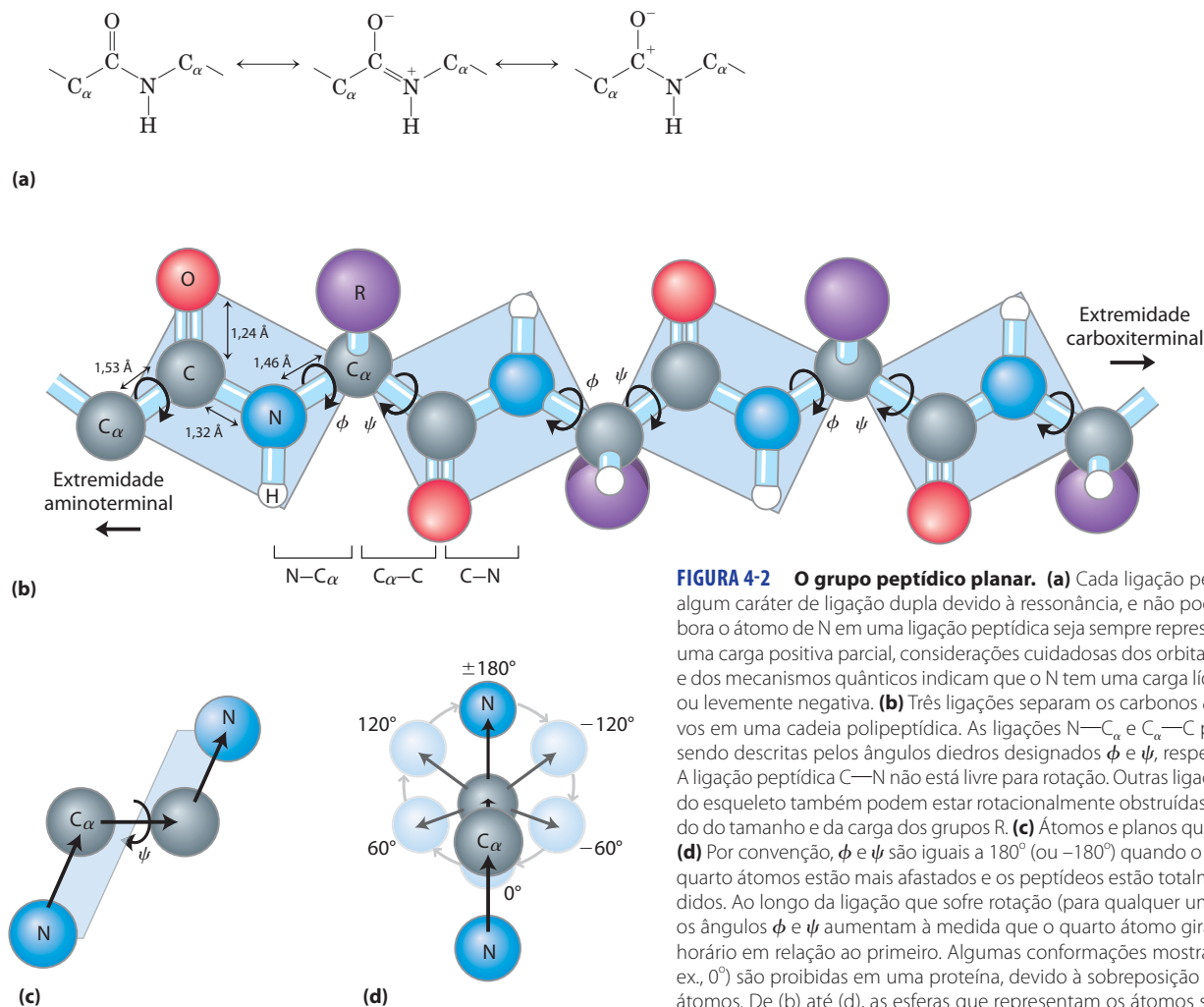



**FIGURA 4-2 O grupo peptídico planar.** **(a)** Cada ligação peptídica tem algum caráter de ligação dupla devido à ressonância, e não pode girar. Embora o átomo de N em uma ligação peptídica seja sempre representado com uma carga positiva parcial, considerações cuidadosas dos orbitais de ligação e dos mecanismos quânticos indicam que o N tem uma carga líquida neutra ou levemente negativa. **(b)** Três ligações separam os carbonos $\alpha$ consecutivos em uma cadeia polipeptídica. As ligações N—$C_\alpha$ e $C_\alpha$—C podem girar, sendo descritas pelos ângulos diedros designados $\phi$ e $\psi$, respectivamente. A ligação peptídica C—N não está livre para rotação. Outras ligações simples do esqueleto também podem estar rotacionalmente obstruídas, dependendo do tamanho e da carga dos grupos R. **(c)** Átomos e planos que definem $\psi$. **(d)** Por convenção, $\phi$ e $\psi$ são iguais a 180° (ou −180°) quando o primeiro e o quarto átomos estão mais afastados e os peptídeos estão totalmente estendidos. Ao longo da ligação que sofre rotação (para qualquer um dos lados), os ângulos $\phi$ e $\psi$ aumentam à medida que o quarto átomo gira no sentido horário em relação ao primeiro. Algumas conformações mostradas aqui (p. ex., 0°) são proibidas em uma proteína, devido à sobreposição espacial dos átomos. De (b) até (d), as esferas que representam os átomos são menores do que os raios de van der Waals para esta escala.

vetor (como mostrado na Figura 4-2c para $\psi$), os ângulos diedros aumentam à medida que o átomo distal (quarto átomo) gira no sentido horário (Figura 4-2d). A partir das posições $\pm180°$, o ângulo diedro aumenta de $-180°$ para $0°$, o ponto no qual o primeiro e o quarto átomos estão eclipsados. A rotação pode continuar de $0°$ a $+180°$ (mesma posição que $-180°$) para retornar a estrutura ao ponto de partida. O terceiro ângulo diedro, $\omega$, nem sempre é considerado. Ele envolve as ligações $C_\alpha$—C—N—$C_\alpha$. A ligação central nesse caso é a ligação peptídica, cuja rotação é restrita. A ligação peptídica está, normalmente (99,6% do tempo), na conformação *trans*, restringindo o $\omega$ a um valor de $\pm180°$. Em um caso raro de ligação peptídica *cis*, $\omega = 0°$. ■

A princípio, $\phi$ e $\psi$ podem ter qualquer valor entre $+180°$ e $-180°$, mas diversos valores são proibidos por impedimento estérico entre os átomos do esqueleto polipeptídico e as cadeias laterais dos aminoácidos. A conformação na qual ambos, $\phi$ e $\psi$, são $0°$ (Figura 4-2d) é proibida por esta razão: essa conformação é apenas um ponto de referência para a descrição dos ângulos diedros. Valores permitidos de $\phi$ e $\psi$ tornam-se evidentes quando $\psi$ é colocado em um gráfico *versus* $\phi$, no **diagrama de Ramachandran** (**Figura 4-3**), introduzido por G. N. Ramachandran. Os diagramas de Ramachandran são ferramentas muito úteis e de uso frequente para testar a qualidade de estruturas tridimensionais de proteínas depositadas em bancos de dados internacionais.

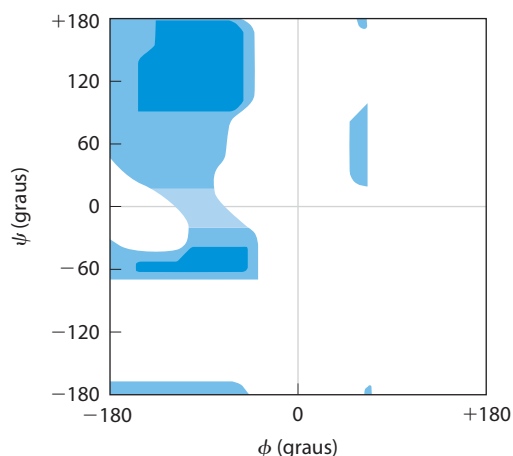



**FIGURA 4-3 Diagrama de Ramachandran para resíduos L-Ala.** A conformação dos peptídeos é definida pelos valores de $\phi$ e $\psi$. Conformações consideradas possíveis são aquelas que envolvem pouco ou nenhum impedimento estérico, com base nos cálculos dos raios de van der Waals conhecidos e dos ângulos diedros. As áreas coloridas em azul-escuro representam as conformações que não envolvem sobreposição estérica se os raios de van der Waals de cada átomo estão modelados como esferas rígidas, e, portanto, são totalmente permitidas; o azul médio indica as conformações permitidas, se for possível a aproximação dos átomos mais 0,1 nm, um leve choque; o azul-claro indica as conformações que são admitidas se for possível uma pequena flexibilidade (poucos graus) no ângulo diedro $\omega$ que descreve a própria ligação peptídica (geralmente presa a 180°). As regiões em branco são conformações não permitidas. A assimetria do diagrama é resultante da estereoquímica L dos resíduos de aminoácidos. Os diagramas para outros resíduos L com cadeias laterais não ramificadas são quase idênticos. Os limites permitidos para resíduos ramificados como Val, Ile e Thr são um pouco menores do que para Ala. O resíduo Gly, que é estericamente menos impedido, apresenta um limite bem mais amplo de conformações permitidas. O limite para os resíduos Pro é muito mais restrito porque seu $\phi$ é limitado entre $-35°$ e $-85°$ pela cadeia lateral cíclica.

## RESUMO 4.1 Visão geral sobre a estrutura das proteínas

- Uma proteína típica geralmente tem uma ou mais estruturas tridimensionais, ou conformações que refletem sua função. Algumas proteínas têm segmentos intrinsecamente desordenados.
- A estrutura da proteína é estabilizada em grande parte por múltiplas interações fracas. As interações hidrofóbicas, derivadas do aumento da entropia da água circundante quando moléculas ou grupos apolares estão agrupados, são os principais contribuintes para a estabilização da forma globular da maioria das proteínas solúveis; as interações de van der Waals também contribuem. As ligações de hidrogênio e interações iônicas são otimizadas nas estruturas termodinamicamente mais estáveis.
- Ligações covalentes não peptídicas, particularmente ligações dissulfeto, são importantes na estabilização da estrutura de algumas proteínas.
- A natureza das ligações covalentes no esqueleto polipeptídico estabelece restrições à estrutura. A ligação peptídica tem um caráter parcial de ligação dupla, que mantém todo o grupo peptídico de seis átomos em uma configuração planar rígida. As ligações N—$C_\alpha$ e $C_\alpha$—C podem girar para definir os ângulos diedros $\phi$ e $\psi$, respectivamente.
- O diagrama de Ramachandran é uma descrição visual das combinações dos ângulos diedros $\phi$ e $\psi$ permitidos em um esqueleto peptídico ou não permitidos devido a impedimentos estéricos.

## 4.2 Estrutura secundária das proteínas

O termo **estrutura secundária** se refere a qualquer segmento de uma cadeia polipeptídica e descreve o arranjo espacial de seus átomos na cadeia principal, sem considerar a posição de suas cadeias laterais ou sua relação com outros segmentos. Uma estrutura secundária *comum* ocorre quando cada ângulo diedro, $\phi$ e $\psi$, permanece igual, ou quase igual, ao longo do segmento. Existem alguns tipos de estruturas secundárias que são particularmente estáveis e ocorrem extensamente em proteínas. As mais conhecidas são as hélices $\alpha$ e as conformações $\beta$; outro tipo comum é a volta $\beta$. Quando um padrão regular não é observado, a estrutura secundária algumas vezes é chamada de indefinida ou espiral aleatória. Esta última, entretanto, não descreve adequadamente a estrutura desses segmentos. O curso da maioria dos esqueletos polipeptídicos em uma proteína típica não é aleatório; ele é altamente específico e inalterado na estrutura e na função de uma proteína em particular. Aqui, a discussão se concentra nas estruturas mais comuns.

### A hélice $\alpha$ é uma estrutura secundária comum em proteínas

**Arquitetura proteica – hélice $\alpha$** Pauling e Corey sabiam da importância das ligações de hidrogênio na orientação de grupos polares como os grupos C═O e N—H das ligações peptídicas. Também conheciam os resultados experimentais de William Astbury, que, em 1930, conduziu estudos pio-

neiros de proteínas com raios X. Astbury demonstrou que proteínas que formam os cabelos e os espinhos do porco-espinho (a proteína fibrosa α-queratina) têm uma estrutura regular que se repete a cada 5,15 a 5,2 Å. (O ângstrom, Å, em homenagem ao físico Anders J. Ångström, é igual a 0,1 nm. Apesar de não ser uma unidade do SI, ela é universalmente utilizada pelos biólogos estruturais para descrever as distâncias atômicas – é aproximadamente o tamanho de uma ligação C—H comum.) Com essa informação e seus dados sobre ligação peptídica, e com a ajuda de modelos construídos de forma precisa, Pauling e Corey iniciaram a determinação das conformações prováveis das moléculas de proteínas.

O primeiro avanço ocorreu em 1948. Pauling foi um professor visitante na Universidade de Oxford, ficou doente e se recolheu a seu apartamento por alguns dias para descansar. Entediado com a leitura disponível, Pauling pegou alguns papéis e lápis para trabalhar em uma estrutura estável plausível que poderia ser adotada por uma cadeia polipeptídica. O modelo que ele desenvolveu, confirmado mais tarde no trabalho com Corey e o colaborador Herman Branson, foi o arranjo mais simples que a cadeia polipeptídica pode assumir que maximiza o uso de ligações de hidrogênio internas. É uma estrutura helicoidal que Pauling e Corey chamaram de **hélice α** (**Figura 4-4**). Nessa estrutura, o esqueleto polipeptídico é firmemente enrolado em torno de um eixo imaginário desenhado longitudinalmente no centro da hélice, e os grupos R dos resíduos de aminoácidos se projetam para fora do esqueleto helicoidal. A unidade que se repete forma uma volta de hélice, que se estende por cerca de 5,4 Å ao longo do eixo, levemente maior do que a periodicidade observada por Astbury na análise por raios X da queratina do cabelo. Os átomos do esqueleto dos resíduos de aminoácidos em uma hélice α típica têm um grupo característico de ângulos diedros que definem a conformação da hélice α (Tabela 4-1), e cada volta de hélice é formada por 3,6 resíduos de aminoácidos. Os segmentos de hélice α em proteínas normalmente se desviam um pouco desses ângulos diedros, podendo até variar dentro de um mesmo segmento, gerando curvaturas ou torções do eixo da hélice. Pauling e Corey consideraram as variantes da hélice α voltadas tanto para direita quanto para esquerda. A elucidação da estrutura tridimensional subsequente da hélice α da mioglobina e de outras proteínas mostrou que a hélice α voltada para direita é a forma comum (Quadro 4-1). As hélices α estendidas voltadas para esquerda são teoricamente menos estáveis e não foram observadas em proteínas. A hélice α é a estrutura predominante nas α-queratinas. De forma geral, cerca de um quarto de todos os resíduos de aminoácidos das proteínas é encontrado em hélices α. A fração exata varia muito de uma proteína para outra.

Por que as hélices α se formam mais facilmente do que qualquer outra conformação possível? A resposta encontra-se, em parte, no uso otimizado das ligações de hidrogênio

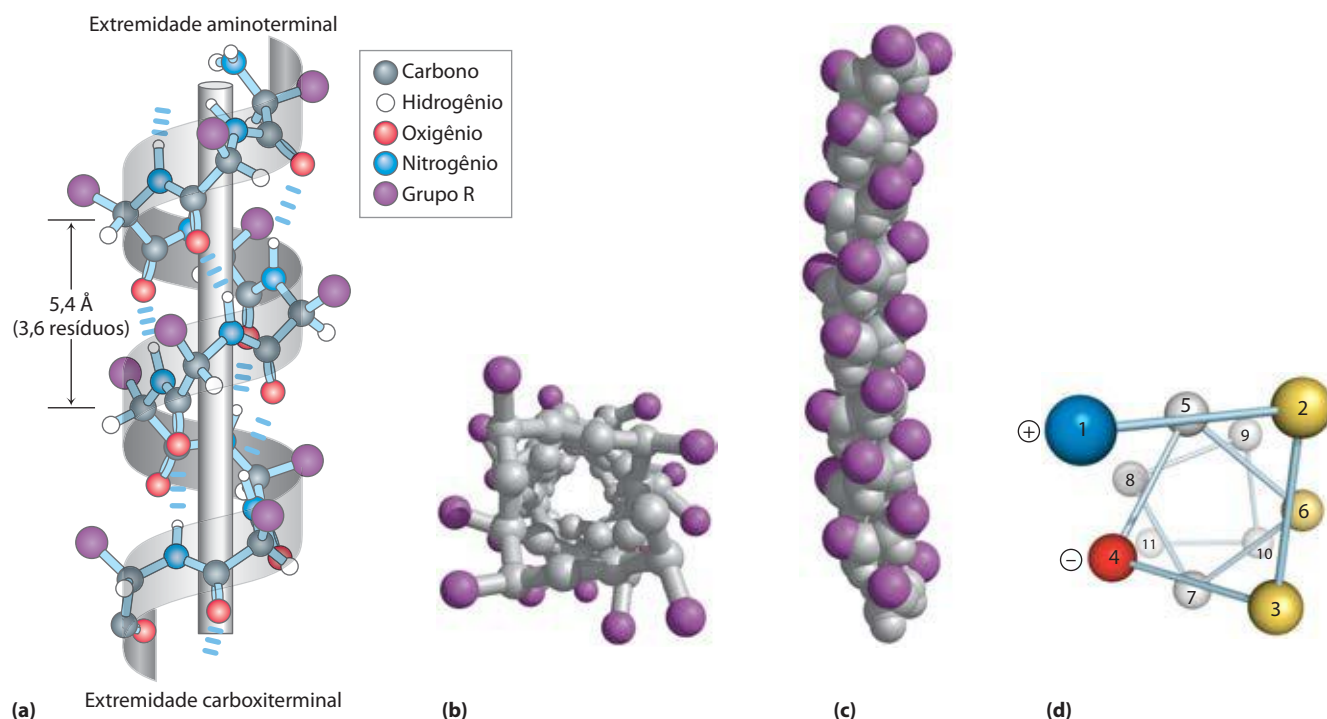



**FIGURA 4-4 Modelos de hélice α, mostrando os diferentes aspectos de sua estrutura. (a)** Modelo de esfera e bastão mostrando as ligações de hidrogênio internas da cadeia. A unidade que se repete forma uma volta da hélice: 3,6 resíduos. **(b)** Hélice α vista de uma de suas extremidades, ao longo do eixo central (obtida a partir do PDB ID 4TNC). Observe as posições dos grupos R, representados pelas esferas roxas. Observe modelo de esfera e bastão, que ressalta o arranjo helicoidal, dá uma falsa impressão de que a hélice é oca, pois as esferas não mostram os raios de van der Waals de cada um dos átomos. **(c)** Como este modelo de volume atômico mostra, os átomos no centro da hélice α estão em contato estreito. **(d)** Projeção da rotação helicoidal de uma hélice α. Esta representação é colorida para a identificação de superfícies com determinadas propriedades. Os resíduos em amarelo, por exemplo, podem ser hidrofóbicos e fazer parte de uma interface entre a hélice mostrada aqui e outra parte do mesmo ou de outro polipeptídeo. Os resíduos vermelhos (negativo) e azuis (positivo) ilustram o potencial de interação de cadeias laterais de cargas opostas, separadas por dois resíduos na hélice.

**TABELA 4-1** Ângulos $\phi$ e $\psi$ ideais para estruturas secundárias comuns em proteínas

| Estrutura | $\phi$ | $\psi$ |
|---|---|---|
| Hélice $\alpha$ | –57° | –47° |
| Conformação $\beta$ | | |
| Antiparalela | –139° | +135° |
| Paralela | –119° | +113° |
| Tripla hélice de colágeno | –51° | +153° |
| Volta $\beta$ tipo I | | |
| i + 1* | –60° | –30° |
| i + 2* | –90° | 0° |
| Volta $\beta$ tipo II | | |
| i + 1 | –60° | +120° |
| i + 2 | +80° | 0° |

**Nota**: Nas proteínas reais, os ângulos diedros frequentemente são um pouco diferentes desses valores ideais.
*Os ângulos i + 1 e i + 2 são aqueles para o segundo e terceiro resíduos de aminoácidos na volta $\beta$, respectivamente.

internas. A estrutura é estabilizada por uma ligação de hidrogênio entre o átomo de hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio eletronegativo de uma ligação peptídica e o átomo de oxigênio eletronegativo da carbonila do quarto aminoácido no lado aminoterminal da ligação peptídica (Figura 4-4a). Na hélice $\alpha$, cada ligação peptídica (exceto aquelas próximas às extremidades da hélice $\alpha$) participa de tais ligações de hidrogênio. Cada volta sucessiva da hélice $\alpha$ é mantida por voltas adjacentes por três ou quatro ligações de hidrogênio, conferindo uma significativa estabilidade à estrutura global. Nas extremidades de um segmento $\alpha$-helicoidal, sempre há três ou quatro grupos carbonila ou amino que não podem participar desse padrão helicoidal de ligações de hidrogênio. Esses podem estar expostos ao solvente circundante, onde suas ligações de hidrogênio com a água ou com outras partes da proteína podem proteger a hélice e proporcionar os parceiros necessários para a ligação de hidrogênio.

Outros experimentos mostraram que uma hélice $\alpha$ pode ser formada em polipeptídeos constituídos de L ou D-aminoácidos. Entretanto, todos os resíduos devem ser de um mesmo estereoisômero; um D-aminoácido irá romper a estrutura regular formada por L-aminoácidos, e vice-versa. A forma mais estável de uma hélice $\alpha$ de D-aminoácidos é a voltada para a esquerda.

**PROBLEMA RESOLVIDO 4-1** **Estrutura secundária e dimensões de uma proteína**

Qual é o comprimento de uma cadeia polipeptídica de 80 resíduos de aminoácidos em uma única hélice $\alpha$?

**Solução:** Uma hélice $\alpha$ ideal tem 3,6 resíduos por volta, e o avanço ao longo do eixo helicoidal é de 5,4 Å. Portanto, o avanço sobre o eixo, para cada resíduo de aminoácido, é de 1,5 Å. O comprimento do peptídeo é, portanto, 80 resíduos × 1,5 Å/resíduo = 120 Å.

## A sequência de aminoácidos afeta a estabilidade da hélice $\alpha$

Nem todos os polipeptídeos podem formar uma hélice $\alpha$ estável. Cada resíduo de aminoácido em um polipeptídeo tem uma propensão intrínseca de formar uma hélice $\alpha$ (Tabela 4-2), consequência das propriedades de seu grupo R e como elas interferem na capacidade de seus átomos de conexão da cadeia principal em aceitar os ângulos $\phi$ e $\psi$ característicos. A alanina apresenta a melhor tendência a formar hélices $\alpha$ na maioria dos sistemas-modelo experimentais.

A posição de um resíduo de aminoácido em relação a seus vizinhos também é importante. Interações entre cadeias laterais dos aminoácidos podem estabilizar ou desestabilizar a estrutura $\alpha$-helicoidal. Por exemplo, se uma cadeia polipeptídica possui uma longa sequência de resíduos

**QUADRO 4-1** **MÉTODOS** **Distinção entre o giro para a direita e o giro para a esquerda**

Existe um método simples para determinar se uma estrutura helicoidal gira para a direita ou para a esquerda. Faça uma associação com suas duas mãos, com os polegares esticados, apontando para longe de você. Olhando para a sua mão direita, pense em uma hélice se enrolando ao longo de seu polegar direito, na direção dos seus outros dedos, dobrados conforme mostrado na figura (sentido horário). A hélice resultante gira para a direita. Sua mão esquerda representará uma hélice que gira para a esquerda no sentido anti-horário à medida que se enrola em seu polegar.

**TABELA 4-2** Tendência dos resíduos de aminoácidos em assumir a conformação de hélice $\alpha$

| Aminoácido | $\Delta\Delta G^o$ (kJ/mol)* | Aminoácido | $\Delta\Delta G^o$ (kJ/mol)* |
|---|---|---|---|
| Ala | 0 | Leu | 0,79 |
| Arg | 0,3 | Lys | 0,63 |
| Asn | 3 | Met | 0,88 |
| Asp | 2,5 | Phe | 2,0 |
| Cys | 3 | Pro | > 4 |
| Gln | 1,3 | Ser | 2,2 |
| Glu | 1,4 | Thr | 2,4 |
| Gly | 4,6 | Tyr | 2,0 |
| His | 2,6 | Trp | 2,0 |
| Ile | 1,4 | Val | 2,1 |

**Fontes:** Dados (exceto para a prolina) de Bryson, J.W., Betz, S.F., Lu, H.S., Suich, D.J., Zhou, H.X., O'Neil, K.T. e DeGrado, W.F. (1995) Protein design: a hierarchic approach. *Science* **270**, 935. Dados sobre a prolina de Myers, J.K., Pace, C.N. e Scholtz, J.M. (1997) Helix propensities are identical in proteins and peptides. *Biochemistry* **36**, 10, 926.

*$\Delta\Delta G^o$ é a diferença de variação de energia livre, relativa àquela para a alanina, necessária para que os resíduos de aminoácidos assumam a conformação em hélice $\alpha$. Valores maiores refletem uma grande dificuldade para assumir a conformação em hélice. O conjunto de dados é derivado de múltiplos experimentos e sistemas experimentais.

Glu, esse segmento da cadeia não irá formar uma hélice $\alpha$ em pH 7,0. Os grupos carboxílicos, carregados negativamente, dos resíduos Glu adjacentes repelem-se mutuamente de forma tão forte que impedem a formação da hélice $\alpha$. Pela mesma razão, se existem muitos resíduos Lys e/ou Arg, com grupos R carregados positivamente em pH 7,0, eles também se repelem, impedindo a formação da hélice $\alpha$. O volume e a forma dos resíduos Asn, Ser, Thr e Cys também podem desestabilizar uma hélice $\alpha$ se estiverem muito próximos na cadeia.

A torção de uma hélice garante que ocorram interações críticas entre a cadeia lateral de um aminoácido e a cadeia lateral do terceiro (às vezes quarto) resíduo adiante, para ambos os lados da hélice. Isso fica claro quando a hélice $\alpha$ é representada como roda helicoidal (Figura 4-4d). Os aminoácidos carregados positivamente costumam ser encontrados a três resíduos de distância dos aminoácidos carregados negativamente, possibilitando a formação de pares iônicos. Dois aminoácidos aromáticos com frequência são espaçados de forma semelhante, resultando em uma interação hidrofóbica.

Uma restrição à formação da hélice $\alpha$ é a presença de resíduos de Pro e Gly, que apresentam a menor propensão em formar hélices $\alpha$. Na prolina, o átomo de nitrogênio faz parte de um anel rígido (ver Figura 4-8), e a rotação sobre a ligação N—$C_\alpha$ não é possível. Dessa forma, um resíduo Pro gera uma torção, que desestabiliza a hélice. Além disso, o átomo de nitrogênio do resíduo Pro em uma ligação peptídica não tem hidrogênio para participar em ligações com outros resíduos. Por essas razões, a prolina raramente é encontrada em uma hélice $\alpha$. A glicina com frequência não ocorre em hélices por outro motivo: ela apresenta maior flexibilidade conformacional do que os outros aminoácidos. Polímeros de glicina tendem a formar estruturas espiraladas bem diferentes de uma hélice $\alpha$.

Um último fator que afeta a estabilidade de uma hélice $\alpha$ é a identidade dos resíduos de aminoácido próximos às extremidades do segmento $\alpha$-helicoidal do polipeptídeo. Existe um pequeno dipolo elétrico em cada ligação peptídica (Figura 4-2a). Esses dipolos estão alinhados através das ligações de hidrogênio da hélice, resultando em um dipolo livre ao longo do eixo helicoidal que aumenta com o comprimento da hélice (**Figura 4-5**). As cargas parcialmente positivas e negativas do dipolo da hélice ocorrem nos grupos amino e carbonil próximos às extremidades amino e carboxiterminal, respectivamente. Por isso, aminoácidos carregados negativamente costumam ser encontrados próximos à extremidade aminoterminal do segmento helicoidal, onde apresentam interações estabilizantes com a carga positiva do dipolo da hélice; um aminoácido positivamente carregado na extremidade aminoterminal desestabilizaria o sistema. O oposto é verdade para a extremidade carboxiterminal do segmento helicoidal.

Resumindo, cinco tipos de restrições influenciam a estabilidade de uma hélice $\alpha$: (1) a tendência intrínseca de um resíduo de aminoácido de formar uma hélice $\alpha$; (2) as interações entre os grupos R, especialmente aqueles espaçados por três (ou quatro) aminoácidos; (3) os volumes de grupos R adjacentes; (4) a ocorrência de resíduos Pro e Gly; e (5) interações entre os resíduos de aminoácidos das extremidades do segmento helicoidal e o dipolo elétrico inerente da hélice $\alpha$. A tendência de um determinado segmento de uma cadeia polipeptídica de formar uma hélice $\alpha$ depende, portanto, da identidade e da sequência de resíduos de aminoácidos do segmento.

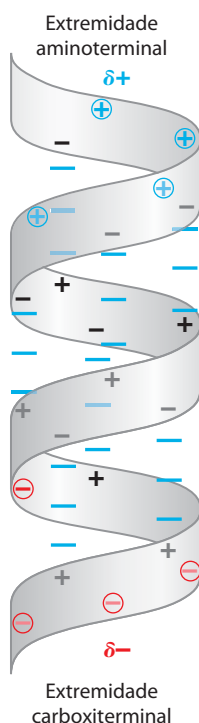



**FIGURA 4-5 Dipolo da hélice.** O dipolo elétrico da ligação peptídica (ver Figura 4-2a) é transmitido ao longo do segmento $\alpha$-helicoidal pelas ligações de hidrogênio intracadeia, resultando em um dipolo da hélice. Nesta ilustração, os componentes amino e carbonil de cada ligação peptídica estão indicados com os símbolos + e –, respectivamente. Os componentes amino e carbonil das ligações peptídicas próximas às extremidades da região $\alpha$-helicoidal, que não participam de ligações de hidrogênio, estão circulados e mostrados em cores.

## As conformações β organizam as cadeias polipeptídicas em forma de folha

**Arquitetura proteica – folha β** Em 1951, Pauling e Corey reconheceram um segundo tipo de estrutura recorrente, a **conformação β**. Essa é uma conformação mais estendida das cadeias polipeptídicas, e sua estrutura é de novo definida pelos esqueletos dos átomos arranjados de acordo com grupo característico de ângulos diedro (Tabela 4-1). Na conformação β, o esqueleto da cadeia polipeptídica está estendido em forma de zigue-zague, em vez de em estrutura helicoidal (**Figura 4-6**). O arranjo de vários segmentos lado a lado, os quais estão na conformação β, é chamado de **folha β**. *A* estrutura em zigue-zague dos segmentos polipeptídicos individuais dá origem a uma aparência pregueada da folha em geral. As ligações de hidrogênio são formadas entre segmentos adjacentes da cadeia polipeptídica, dentro da folha. Os segmentos que formam a folha β normalmente estão próximos na cadeia polipeptídica, mas também podem estar bem distantes uns dos outros na sequência linear do polipeptídeo; eles podem até estar em cadeias polipeptídicas diferentes. Os grupos R dos aminoácidos adjacentes se projetam da estrutura em zigue-zague em direções opostas, criando um padrão alternado que pode ser observado na visão lateral da Figura 4-6.

**FIGURA 4-6 A conformação β das cadeias polipeptídicas.** Estas visões **(a)** lateral e **(b, c)** superior mostram os grupos R saindo do plano da folha β e enfatizam a forma pregueada formada pelos planos das ligações peptídicas. (Um nome alternativo para esta estrutura é folha β pregueada.) As ligações de hidrogênio entre as cadeias adjacentes também são mostradas. A orientação das cadeias adjacentes (setas), do aminoterminal para carboxiterminal, pode ser a mesma ou oposta, formando (b) folhas β antiparalelas ou (c) folhas β paralelas.

As cadeias polipeptídicas adjacentes em uma folha β podem ser tanto paralelas quanto antiparalelas (apresentando uma orientação aminocarboxiterminal igual ou oposta, respectivamente). As estruturas são, de alguma forma, semelhantes, apesar de o período de repetição ser menor na conformação paralela (6,5 Å, *versus* 7 Å para a antiparalela) e o padrão das ligações de hidrogênio ser diferente. As ligações de hidrogênio intersegmentos são alinhadas (ver Figura 2-5) na folha β antiparalela, enquanto elas são distorcidas ou não alinhadas na variante paralela. As estruturas ideais exibem os ângulos de ligação dados na Tabela 4-1; esses valores variam um pouco nas proteínas verdadeiras, resultando em uma variação estrutural, conforme visto anteriormente para as hélices α.

## Voltas β são comuns em proteínas

**Arquitetura proteica – voltas β** Em proteínas globulares, que apresentam estrutura dobrada compacta, alguns resíduos de aminoácidos estão em voltas ou alças onde a cadeia polipeptídica inverte sua direção (**Figura 4-7**). Esses são elementos conectores que ligam estruturas sucessivas de hélices α e conformações β. As **voltas β** são particularmente comuns e conectam as extremidades de dois segmentos adjacentes de uma folha β antiparalela. A estrutura é uma volta de 180° que envolve quatro resíduos de aminoácidos, com o oxigênio carbonílico do primeiro resíduo formando uma ligação de hidrogênio com o hidrogênio do grupo amino do quarto resíduo. Os grupos peptídicos dos dois resíduos centrais não participam de nenhuma ligação de hidrogênio inter-resíduos. Vários tipos de voltas β têm sido descritas, cada uma definida pelos ângulos $\phi$ e $\psi$ das ligações que ligam os quatro resíduos de aminoácidos que formam a volta em particular (Tabela 4-1). Os resíduos Gly e Pro frequentemente ocorrem em voltas β; o primeiro porque é pequeno e flexível, e o último porque as ligações peptídicas envolvendo o nitrogênio imino da prolina facilmente assumem configuração *cis* (**Figura 4-8**), forma particularmente acessível em uma volta fechada. Os dois tipos de voltas β, mostrados na Figura 4-7, são os mais comuns. As voltas normalmente são encontradas próximas à superfície das proteínas, onde os grupos peptídicos dos dois resíduos de aminoácidos centrais da alça podem fazer ligação de hidrogênio com a água. Muito menos comum é a volta γ, uma volta com três resíduos e ligação de hidrogênio entre o primeiro e o terceiro resíduo.

## Estruturas secundárias comuns têm ângulos diedros característicos

As hélices α e as conformações β são as principais estruturas secundárias que se repetem em um grande número de proteínas, apesar de existirem outras estruturas que se repetem em algumas proteínas especializadas (um exemplo é o colágeno; ver Figura 4-13). Cada tipo de estrutura secundária pode ser completamente descrito pelos ângulos diedros $\phi$ e $\psi$, associados a cada resíduo. Como mos-

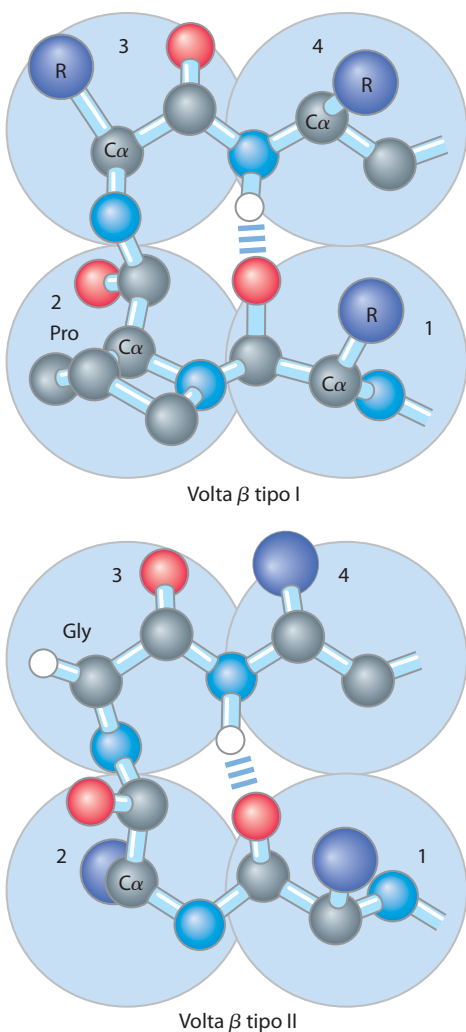



**FIGURA 4-7 Estruturas de voltas $\beta$.** Voltas $\beta$ dos tipos I e II são as mais comuns; distinguem-se pelos ângulos $\phi$ e $\psi$ adotados pelo esqueleto peptídico na volta (ver Tabela 4-1). As voltas do tipo I ocorrem duas vezes mais do que as voltas do tipo II. As voltas $\beta$ do tipo II normalmente possuem uma Gly como terceiro resíduo. Observe a ligação de hidrogênio entre os grupos peptídicos do primeiro e do quarto resíduos da volta. (Cada um dos resíduos de aminoácidos está identificado por grandes círculos azuis. Nem todos os átomos de H estão mostrados.)

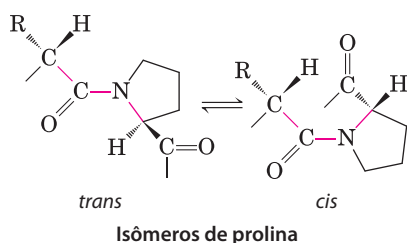



**FIGURA 4-8 Isômeros *trans* e *cis* de uma ligação peptídica envolvendo o nitrogênio imino da prolina.** Das ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos que não Pro, mais de 99,95% estão na configuração *trans*. Para as ligações peptídicas envolvendo o nitrogênio imino da prolina, no entanto, cerca de 6% estão na configuração *cis*; muitas delas ocorrem em voltas $\beta$.

trado no diagrama de Ramachandran, os ângulos diedros que definem a hélice $\alpha$ e a conformação $\beta$ se encontram em uma região restrita de estruturas estericamente permitidas (**Figura 4-9a**). A maioria dos valores de $\phi$ e $\psi$ obtidos de estruturas de proteínas conhecidas cai nas regiões esperadas, com alta concentração próximo aos valores preditos para as hélices $\alpha$ e as conformações $\beta$ (Figura 4-9b). O único resíduo de aminoácido normalmente encontrado fora dessas regiões é a glicina. Como sua cadeia lateral é pequena, o resíduo Gly pode assumir diversas conformações estericamente proibidas para os demais aminoácidos.

## As estruturas secundárias comuns podem ser identificadas por dicroísmo circular

Qualquer forma de assimetria estrutural em uma molécula leva a diferenças de absorção da luz circularmente polari-

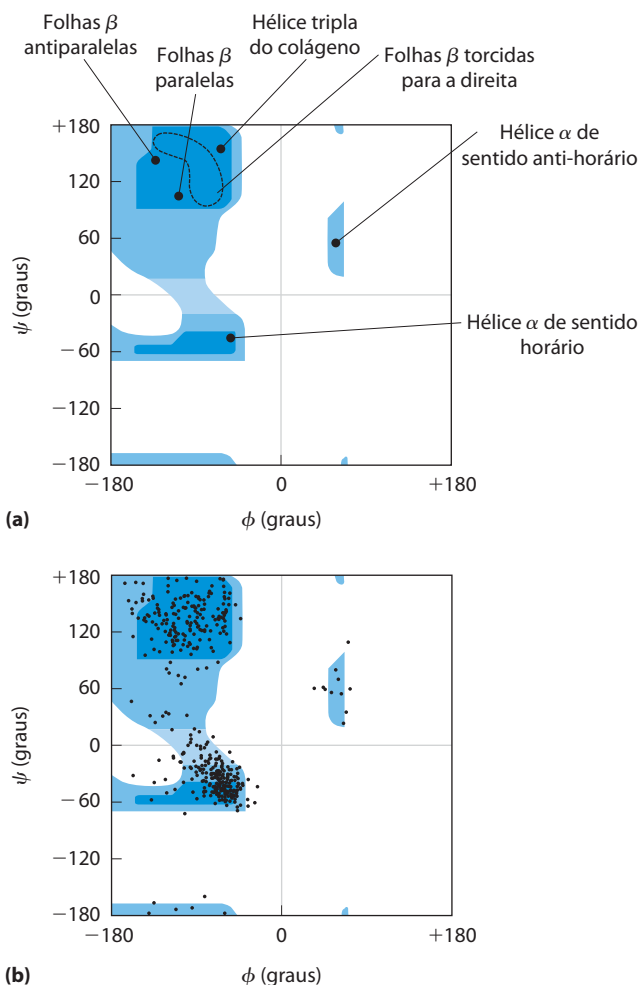



**FIGURA 4-9 Diagrama de Ramachandran mostrando uma variedade de estruturas. (a)** Os valores de $\phi$ e $\psi$ de várias estruturas secundárias permitidas estão sobrepostos no diagrama da Figura 4-3. Apesar de as hélices $\alpha$ de sentido anti-horário com vários resíduos de aminoácidos serem teoricamente permitidas, elas não têm sido observadas em proteínas. **(b)** Os valores de $\phi$ e $\psi$ para todos os aminoácidos, exceto Gly, da enzima piruvato-cinase (isolada de coelho) estão sobrepostos no diagrama das conformações teoricamente permitidas (Figura 4-3). Os pequenos e flexíveis resíduos de Gly foram excluídos, pois em geral caem fora da região esperada (em azul).

zada para a esquerda em relação à direita. A medida desta diferença é chamada de **espectroscopia de dicroísmo circular** (**CD**, *de circular dichroism*). Uma estrutura ordenada, como de uma proteína dobrada, resulta em um espectro de absorção que pode ter picos ou regiões com valores tanto positivos, quanto negativos. Para proteínas, os espectros são obtidos na região de UV distante (190 a 250 nm). A entidade que absorve luz, ou cromóforo, nessa região é a ligação peptídica; um sinal é obtido quando esta ligação peptídica está em um ambiente dobrado. A diferença em coeficiente de extinção molar (ver Quadro 3-1) para a luz circularmente polarizada para a esquerda e para a direita ($\Delta\varepsilon$) é colocada no gráfico em função do comprimento de onda. As hélices $\alpha$ e as conformações $\beta$ têm espectros de CD característicos (**Figura 4-10**). Com o espectro de CD, os bioquímicos podem determinar se as proteínas estão dobradas corretamente, estimar a fração da proteína que assume qualquer uma das duas estruturas secundárias comuns e monitorar as transições entre os estados dobrados e não dobrados.

### RESUMO 4.2 Estrutura secundária das proteínas

- Estrutura secundária é o arranjo espacial dos átomos da cadeia principal em um determinado segmento da cadeia polipeptídica.
- As estruturas secundárias regulares mais comuns são as hélices $\alpha$, as conformações $\beta$ e as voltas $\beta$.
- A estrutura secundária de um segmento polipeptídico pode ser completamente definida se seus ângulos $\phi$ e $\psi$ são conhecidos para todos os aminoácidos do segmento.
- A espectroscopia de dicroísmo circular é um método para a identificação das estruturas secundárias comuns e o monitoramento do enovelamento das proteínas.

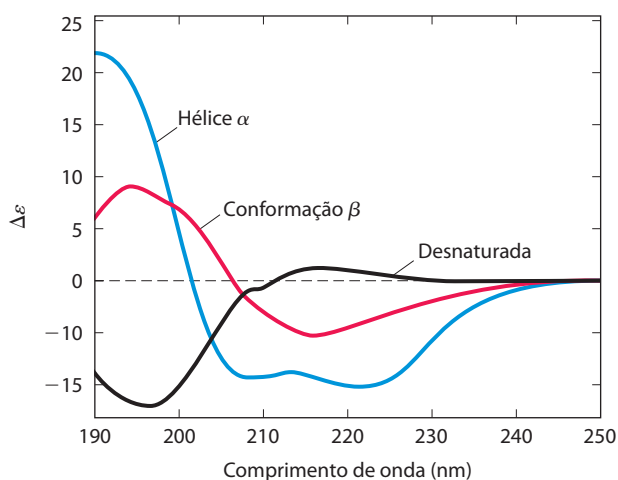



**FIGURA 4-10 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD).** Este espectro mostra a polilisina inteiramente como hélice $\alpha$, como conformação $\beta$ ou desnaturada, espiral aleatória. A unidade do eixo y é uma simplificação das unidades comumente utilizadas nos experimentos de CD. Como as curvas são diferentes para as hélices $\alpha$, as conformações $\beta$ e a desnaturada, o espectro de CD fornece a determinada proteína uma estimativa da fração da proteína, formada pelas duas estruturas secundárias mais comuns. O espectro de CD da proteína nativa pode servir como referência para o estado enovelado, e é útil no monitoramento da desnaturação, ou de mudanças conformacionais resultantes de alterações nas condições de solução.

## 4.3 Estruturas terciária e quaternária das proteínas

**Arquitetura proteica – Introdução da estrutura terciária** O arranjo tridimensional total de todos os átomos de uma proteína é chamado de **estrutura terciária**. Enquanto o termo "estrutura secundária" se refere ao arranjo espacial dos resíduos de aminoácidos adjacentes em um segmento polipeptídico, a estrutura terciária inclui aspectos de *alcance mais longo* da sequência de aminoácidos. Aminoácidos que estão bem distantes na sequência polipeptídica e em diferentes tipos de estruturas secundárias podem interagir na estrutura da proteína completamente dobrada. A localização das curvaturas (incluindo as voltas $\beta$) nas cadeias polipeptídicas e sua direção e seu ângulo são determinados pelo número e pela localização de resíduos específicos que tendem a formá-las, como Pro, Thr, Ser e Gly. Segmentos da cadeia polipeptídica que interagem entre si são mantidos em suas posições terciárias características por diferentes tipos de interações fracas (e algumas vezes por ligações covalentes, como ligações dissulfeto) entre os segmentos.

Algumas proteínas contêm duas ou mais cadeias polipeptídicas distintas, ou subunidades, que podem ser idênticas ou diferentes. O arranjo destas subunidades proteicas em complexos tridimensionais constitui a **estrutura quaternária**.

Considerando esses níveis mais altos de estrutura, é conveniente designar dois grandes grupos nos quais muitas proteínas podem ser classificadas: **proteínas fibrosas**, com cadeias polipeptídicas arranjadas em longos filamentos ou folhas, e **proteínas globulares**, com cadeias polipeptídicas dobradas em forma esférica ou globular. Os dois grupos são estruturalmente distintos. As proteínas fibrosas em geral são formadas por um único tipo de estrutura secundária, e sua estrutura terciária é relativamente simples. As proteínas globulares normalmente contêm diversos tipos de estruturas secundárias. Os dois grupos também se diferenciam funcionalmente: as estruturas que garantem suporte, forma e proteção externa aos vertebrados são feitas de proteínas fibrosas, enquanto as enzimas e as proteínas reguladoras em sua maioria são proteínas globulares.

### As proteínas fibrosas são adaptadas às funções estruturais

**Arquitetura proteica – Estrutura terciária da proteína fibrosa** A $\alpha$-queratina, o colágeno e a fibroína da seda ilustram bem a relação entre a estrutura da proteína e sua função biológica (Tabela 4-3). As proteínas fibrosas compartilham propriedades que dão força e/ou flexibilidade às estruturas nas quais ocorrem. Em cada caso, a unidade estrutural fundamental é um elemento simples de estrutura secundária que se repete. Todas as proteínas fibrosas são insolúveis em água, propriedade conferida pela alta concentração de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos tanto no interior quanto na superfície da proteína. Essas superfícies hidrofóbicas estão em grande parte escondidas, visto que muitas cadeias polipeptídicas similares são reunidas formando um complexo supramolecular. A simplicidade estrutural das proteínas fibrosas as torna particularmente interessantes para ilus-

trar alguns dos princípios fundamentais da estrutura proteica discutidos anteriormente.

**$\alpha$-Queratina** As $\alpha$-queratinas foram desenvolvidas para força. Encontradas somente em mamíferos, essas proteínas constituem praticamente todo o peso seco de cabelos, pelos, unhas, garras, penas, chifres, cascos e grande parte da camada mais externa da pele. As $\alpha$-queratinas fazem parte de uma família mais ampla de proteínas chamadas de proteínas de filamento intermediário (FI). Outras proteínas FI são encontradas no citoesqueleto de células animais. Todas as proteínas FI têm função estrutural e compartilham das características estruturais das $\alpha$-queratinas.

A hélice da $\alpha$-queratina é uma hélice $\alpha$ voltada para a direita, a mesma hélice encontrada em várias outras proteínas. Francis Crick e Linus Pauling, no início de 1950, sugeriram, independentemente, que as hélices $\alpha$ da queratina estavam arranjadas na forma de espiral enrolada. Duas fibras de $\alpha$-queratina, orientadas em paralelo (com seus aminoterminais na mesma extremidade), são enroladas uma sobre a outra, formando uma espiral enrolada supertorcida. A supertorção amplifica a força da estrutura como um todo, assim como as fibras são trançadas para formar uma corda forte (**Figura 4-11**). A torção do eixo de uma hélice $\alpha$ para formar uma espiral enrolada explica a discrepância entre os 5,4 Å por volta preditos por Pauling e Corey, e as estruturas repetidas a cada 5,15 a 5,2 Å observadas na difração de raios X do cabelo (p. 120). O sentido da hélice das estruturas supertorcidas é anti-horário, oposto ao da hélice $\alpha$. As superfícies onde as duas hélices $\alpha$ se tocam são formadas por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, e seus grupos R se entrelaçam em um padrão regular interconectado. Isso permite um arranjo próximo das cadeias polipeptídicas dentro da estrutura supertorcida no sentido anti-horário. Não é surpresa, portanto, que a $\alpha$-queratina seja rica em resíduos hidrofóbicos Ala, Val, Leu, Ile, Met e Phe.

Um polipeptídeo na $\alpha$-queratina com as cadeias em espiral enrolada tem uma estrutura terciária relativamente simples, dominada por uma estrutura secundária $\alpha$-helicoidal, com seu eixo enrolado em uma super-hélice anti-horária. O entrelaçamento de dois peptídeos $\alpha$-helicoidais é um exemplo de estrutura quaternária. Espirais enroladas desse tipo são elementos estruturais comuns em proteínas filamentosas e na proteína muscular miosina (ver Figura 5-27). A estrutura quaternária da $\alpha$-queratina pode ser bem complexa. Várias espirais enroladas podem ser associadas em grandes complexos supramoleculares, como o arranjo da $\alpha$-queratina para formar o filamento intermediário do cabelo (Figura 4-11b).

A resistência das proteínas fibrosas é aumentada pelas ligações covalentes entre as cadeias polipeptídicas nas "cordas" multi-helicoidais e entre cadeias adjacentes em um arranjo supramolecular. Nas $\alpha$-queratinas, as ligações entre as cadeias que estabilizam a estrutura quaternária são ligações dissulfeto (Quadro 4-2). Nas $\alpha$-queratinas mais

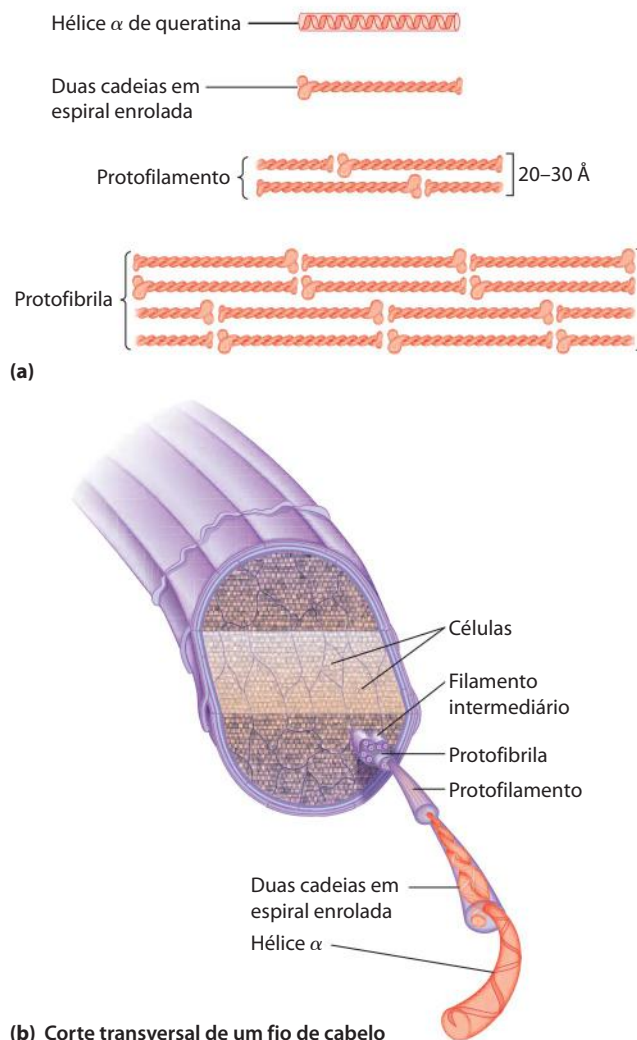
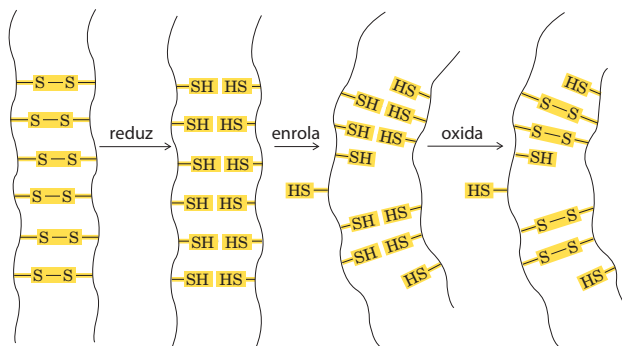



**FIGURA 4-11 Estrutura do cabelo. (a)** A $\alpha$-queratina do cabelo é uma longa hélice $\alpha$ com elementos mais densos próximos às extremidades amino e carboxiterminais. Os pares destas hélices são enrolados em um sentido anti-horário para formar as duas cadeias em espiral enrolada. Estas, por sua vez, se combinam em estruturas mais complexas, chamadas de protofilamentos e protofibrilas. Cerca de quatro protofibrilas – 32 moléculas de $\alpha$-queratina ao todo – se combinam para formar um filamento intermediário. As duas cadeias em espiral enrolada das várias subestruturas também parecem estar entrelaçadas, mas a orientação destas torções e outros detalhes estruturais não são conhecidos. **(b)** O cabelo é um conjunto de filamentos de $\alpha$-queratina, formado pelas subestruturas mostradas em (a).

**TABELA 4-3** Estrutura secundária e propriedades de algumas proteínas fibrosas

| Estrutura | Características | Exemplos de ocorrência |
|---|---|---|
| Hélices $\alpha$, ligadas por ligações dissulfeto | Estruturas de proteção insolúveis e resistentes, com dureza e flexibilidade variáveis | $\alpha$-Queratina de cabelos, penas, unhas |
| Conformação $\beta$ | Filamentos macios e flexíveis | Fibroínas de seda |
| Hélice tripla de colágeno | Grande resistência à tração, sem elasticidade | Colágeno de tendões, matriz óssea |

## QUADRO 4-2 Ondulação permanente é engenharia bioquímica

Quando os cabelos são expostos ao calor úmido, eles podem ser esticados. No nível molecular, as hélices $\alpha$ da $\alpha$-queratina do cabelo são esticadas até que cheguem a uma conformação $\beta$ completamente estendida. Com o resfriamento espontâneo, elas retornam para a conformação $\alpha$-helicoidal. A "esticabilidade" característica das $\alpha$-queratinas e suas inúmeras ligações dissulfeto constituem a base dos processos da ondulação permanente. Os cabelos que serão cacheados ou encrespados são inicialmente enrolados ao redor de uma forma com um formato adequado. Uma solução de um agente redutor, normalmente um composto contendo um grupo tiol ou sulfidril (—SH), é então aplicada com calor. O agente redutor rompe as ligações transversais pela redução de cada ligação dissulfeto em dois resíduos Cys. O calor úmido quebra as ligações de hidrogênio e provoca o desenrolamento da estrutura da cadeia polipeptídica. Depois de um tempo, a solução redutora é removida, e um agente oxidante é adicionado para fazer *novas* ligações dissulfeto entre pares de resíduos Cys de cadeias adjacentes, mas não dos mesmos pares de antes do tratamento. Depois do cabelo lavado e resfriado, as cadeias polipeptídicas voltam à sua conformação helicoidal. As fibras do cabelo agora enrolam da forma desejada porque as novas ligações dissulfeto transversais exercem uma torção ou rotação sobre os feixes de hélices das fibras. O mesmo processo pode ser usado para o alisamento dos cabelos naturalmente crespos. Um alisamento permanente de cabelo não é permanente de fato, pois o cabelo cresce; e no cabelo novo que substituirá o antigo, a $\alpha$-queratina tem o padrão natural de ligações dissulfeto.

duras e resistentes, como as dos chifres dos rinocerontes, até 18% dos resíduos são cisteínas envolvidas em ligações dissulfeto.

**Colágeno** Assim como as $\alpha$-queratinas, o colágeno evoluiu para garantir resistência. Ele é encontrado nos tecidos conectivos como os tendões, as cartilagens, a matriz orgânica dos ossos e na córnea dos olhos. A hélice de colágeno é uma estrutura secundária única, bem diferente da hélice $\alpha$. Ela gira para esquerda e tem três resíduos de aminoácidos por volta (**Figura 4-12** e Tabela 4-1). O colágeno também é uma espiral enrolada, mas com estruturas terciária e quaternária distintas: três polipeptídeos separados, chamados de cadeias $\alpha$ (não confundir com hélices $\alpha$), são supertorcidos uns sobre os outros (Figura 4-12c). No colágeno, a torção super-helicoidal tem sentido horário, oposto ao da hélice anti-horária das cadeias $\alpha$.

Existem vários tipos de colágenos nos vertebrados. Normalmente, eles contêm em torno de 35% de Gly, 11% de Ala e 21% de Pro e 4-Hyp (4-hidroxiprolina, um aminoácido incomum; ver Figura 3-8a). A gelatina comestível é derivada do colágeno. Tem baixo poder nutricional como proteína, pois o colágeno tem uma quantidade muito baixa dos aminoácidos essenciais à dieta humana. O conteúdo de aminoácidos incomuns do colágeno está relacionado com as restrições estruturais únicas de sua hélice. A sequência de aminoácidos no colágeno geralmente é uma repetição de uma unidade tripeptídica, Gly-X-Y, onde X normalmente é uma Pro e Y em geral é uma 4-Hyp. Somente os resíduos Gly podem ser acomodados nas junções muito apertadas entre as cadeias $\alpha$ individuais (Figura 4-12d). Os resíduos Pro e 4-Hyp permitem a torção acentuada da hélice do colágeno. A sequência de aminoácidos e a estrutura quaternária supertorcida do colágeno permitem uma compactação muito justa de seus três polipeptídeos. A 4-hidroxiprolina tem um papel importante na estrutura do colágeno – e na história do ser humano (Quadro 4-3).

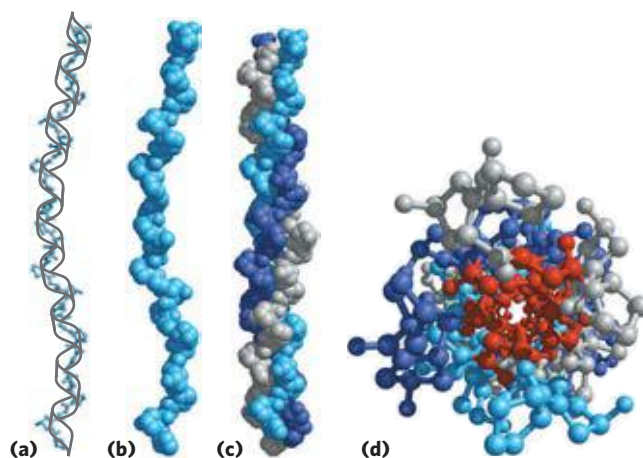



**FIGURA 4-12 Estrutura do colágeno.** (Obtida do PDB ID 1CGD.) **(a)** A cadeia $\alpha$ do colágeno tem uma estrutura secundária repetitiva que é única desta proteína. A sequência tripeptídica que se repete Gly-X-Pro ou Gly-X-4-Hyp adota uma estrutura helicoidal anti-horária com três resíduos por volta. A sequência repetida para gerar este modelo é a Gly-Pro-4-Hyp. **(b)** Modelo de volume atômico da mesma cadeia $\alpha$. **(c)** Três destas hélices (mostradas aqui em cinza, azul e roxo) se enrolam uma sobre as outras, no sentido horário. **(d)** A super-hélice de colágeno formada por três cadeias, mostrada a partir de uma das extremidades, está representada em um modelo de esfera e bastão. Os resíduos de Gly são mostrados em vermelho. A glicina, por ser pequena, é necessária para uma junção firme na região onde as três cadeias estão em contato. As esferas nesta ilustração não representam os raios de van der Waals dos átomos individuais. O centro da super-hélice de três cadeias não é oco, como aparece aqui, mas sim firmemente compacto.

QUADRO 4-3  MEDICINA

## Por que marinheiros, exploradores e universitários devem comer frutas e vegetais frescos

"... por um azar, junto com a insalubridade do país, onde nunca cai uma gota de chuva, fomos acometidos pela "doença", que era tal que toda a carne de nossos braços murchou, e a pele de nossas pernas ficou com manchas escuras, com pedaços bolorentos, como uma bota velha; e uma carne esponjosa surgiu nas gengivas daqueles que pegaram a doença, e ninguém escapou dela, indo direto para as garras da morte. O sinal era o seguinte: quando o nariz começava a sangrar, então a morte estava próxima..."

— Memórias do Lorde de Joinville, 1300 d.C.

Essa passagem descreve a situação do exército de Luís IX no fim da Sétima Cruzada (1248-1254), quando o exército, enfraquecido pelo escorbuto, foi destruído pelos egípcios. Qual a natureza desse mal que acometeu esses soldados do décimo terceiro século?

O escorbuto é causado pela falta de vitamina C, ou ácido ascórbico (ascorbato). A vitamina C é necessária para, entre outras coisas, a hidroxilação da prolina e da lisina no colágeno. O escorbuto é uma doença caracterizada pela degeneração do tecido conectivo, sendo que sua manifestação em estágio avançado inclui inúmeras pequenas hemorragias causadas por vasos sanguíneos frágeis, perda dos dentes, difícil cicatrização de feridas e reabertura de feridas antigas, dor e degeneração dos ossos, e, no final, falência cardíaca. Casos mais brandos de deficiência de vitamina C são acompanhados de fadiga, irritabilidade e aumento da gravidade das infecções do trato respiratório. A maioria dos animais sintetiza grande quantidade de vitamina C pela conversão da glicose em ascorbato em quatro etapas enzimáticas. Contudo, no curso da evolução, os humanos e alguns outros animais – gorilas, cobaias e morcegos frugívoros – perderam a última enzima dessa rota, devendo obter o ascorbato da dieta. A vitamina C é encontrada em uma grande variedade de frutas e vegetais. Até 1800, entretanto, ela estava ausente nos alimentos desidratados e outros suprimentos alimentares estocados para o inverno ou para longas viagens.

O escorbuto foi registrado pelos egípcios em 1500 a.C., e descrito em escritos de Hipócrates, que datam do quinto século a.C. Entretanto, ele não tornou-se uma notícia pública até as viagens de descobrimento europeias de 1500 a 1800. A primeira navegação ao redor do mundo (1519-1522), liderada por Ferdinand Magellan, acabou com a perda de mais de 80% de sua tripulação para o escorbuto. Durante a segunda viagem de Jacques Cartier para explorar o rio St. Lawrence (1535-1536), a tripulação foi ameaçada por um completo desastre, até que um americano nativo ensinou os homens a fazer chá de cedro (contendo vitamina C) que curava e prevenia o escorbuto. As epidemias de escorbuto nos invernos da Europa foram gradativamente sendo eliminadas no século XIX, à medida que a cultura de batata, originária da América do Sul, foi disseminada.

Em 1747, James Lind, cirurgião escocês da Marinha Real, realizou o primeiro estudo clínico controlado registrado na história. Durante uma longa viagem no navio de guerra *HMS Salisbury,* Lind selecionou 12 marinheiros com escorbuto e os dividiu em grupos de dois. Todos os 12 receberam a mesma dieta, exceto que cada um dos grupos recebeu um remédio diferente, dentre os recomendados na época, para o escorbuto. Os marinheiros que receberam limões e laranjas se recuperaram e voltaram ao trabalho. Os marinheiros que receberam suco de maçã fervida tiveram uma pequena melhora. Os outros continuaram a piorar. O *Tratado sobre escorbuto* de Lind foi publicado em 1753, mas a inércia permaneceu na Marinha real por mais 40 anos. Em 1795, o Ministério da Marinha Britânica finalmente ordenou que fosse dada uma ração com suco concentrado de lima ou limão para todos os marinheiros britânicos. O escorbuto continuou a ser um problema em algumas partes do mundo até 1932, quando o cientista húngaro Albert Szent-Györgyi, e W. A. Waugh e C. G. King da Universidade de Pittsburgh isolaram e sintetizaram o ácido ascórbico.

James Lind, 1716–1794; cirurgião da marinha, 1739–1748

O ácido L-ascórbico (vitamina C) é um pó branco, inodoro e cristalino, totalmente solúvel em água e relativamente insolúvel em solventes orgânicos. O pó seco, longe da luz, é estável por um tempo considerável. O consumo diário apropriado dessa vitamina ainda é alvo de debates. O valor recomendado nos Estados Unidos é 90 mg (na Austrália e no Reino Unido, o recomendado é 60 mg; na Rússia, são recomendados 125 mg). Além das frutas cítricas e praticamente todas as outras frutas frescas, boas fontes de vitamina C incluem pimentas, tomates, batatas e brócolis. A vitamina C de frutas e vegetais é destruída por supercozimento ou longa estocagem.

Por que o ascorbato é tão necessário para uma boa saúde? De particular interesse é seu papel na formação de colágeno. Como dito no texto, o colágeno é formado por unidades repetidas de tripeptídeos Gly-X-Y, dos quais X e Y em geral são Pro e 4-Hyp – o derivado de prolina (4*R*)-L-hidroxiprolina, que tem um papel importante no entrelaçamento das fibras do colágeno e na manutenção de sua estrutura. O anel de prolina normalmente é encontrado em duas conformações, chamadas de $C_\gamma$-endo e $C_\gamma$-exo (Figura Q-1). A estrutura da hélice de colágeno necessita de resíduos de Pro na posição Y para estar na conformação $C_\gamma$-exo, sendo essa conformação favorecida pela substituição do hidroxil no C-4 da 4-Hyp. A estrutura de colágeno também requer que o resíduo Pro na posição X tenha uma conformação $C_\gamma$-endo, e a introdução

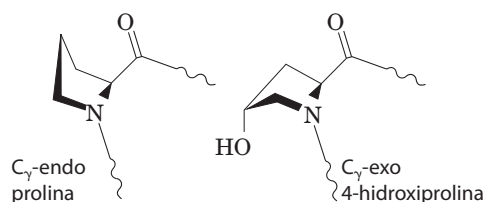



**FIGURA Q-1** Conformação $C_\gamma$-endo da prolina e conformação $C_\gamma$-exo da 4-hidroxiprolina.

da 4-Hyp nessa posição pode desestabilizar a hélice. Na ausência de vitamina C, as células não conseguem hidroxilar a Pro da posição Y. Isso leva a uma instabilidade do colágeno e aos problemas no tecido conectivo observados no escorbuto.

A hidroxilação de resíduos específicos de Pro no pró-colágeno, o precursor do colágeno, requer a ação da enzima prolil 4-hidroxilase. Essa enzima ($M_r$ = 240.000) apresenta-se como um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ em todos os vertebrados. A atividade de hidroxilação da prolina está nas subunidades $\alpha$. Cada subunidade $\alpha$ contém um átomo de ferro não hemínico ($Fe^{2+}$), e a enzima faz parte de uma classe de hidroxilases que necessitam de $\alpha$-cetoglutarato em suas reações.

Em uma reação normal da prolil-4-hidroxilase (Figura Q-2a), uma molécula de $\alpha$-cetoglutarato e uma de $O_2$ se ligam à enzima. O $\alpha$-cetoglutarato é oxidativamente decarboxilado para formar $CO_2$ e succinato. O átomo de oxigênio remanescente é então usado para hidroxilar o resíduo de Pro apropriado no pró-colágeno. Nenhum ascorbato é necessário nessa reação. Entretanto, a prolil-4-hidroxilase também catalisa uma decarboxilação oxidativa de $\alpha$-cetoglutarato não acoplada à hidroxilação da prolina (Figura Q-2b). Durante essa reação, o $Fe^{2+}$ do grupamento heme se oxida, inativando a enzima e impedindo a hidroxilação da prolina. O ascorbato consumido nessa reação é necessário para restaurar a atividade enzimática – pela redução do ferro do grupamento heme.

O escorbuto permanece sendo um problema ainda hoje, não somente em regiões remotas onde os alimentos nutritivos são escassos, mas, surpreendentemente, nos campi de universidades americanas. Os únicos vegetais consumidos pelos estudantes são aqueles em saladas refogadas, e os dias passam sem que esses jovens consumam frutas frescas. Um estudo de 1998, com 230 estudantes da Arizona State University, revelou que 10% deles tinham sérias deficiências de vitamina C, e dois estudantes tinham níveis de vitamina C tão baixos que provavelmente tinham escorbuto. Somente metade dos estudantes nessa pesquisa consumia a quantidade diária recomendada de vitamina C.

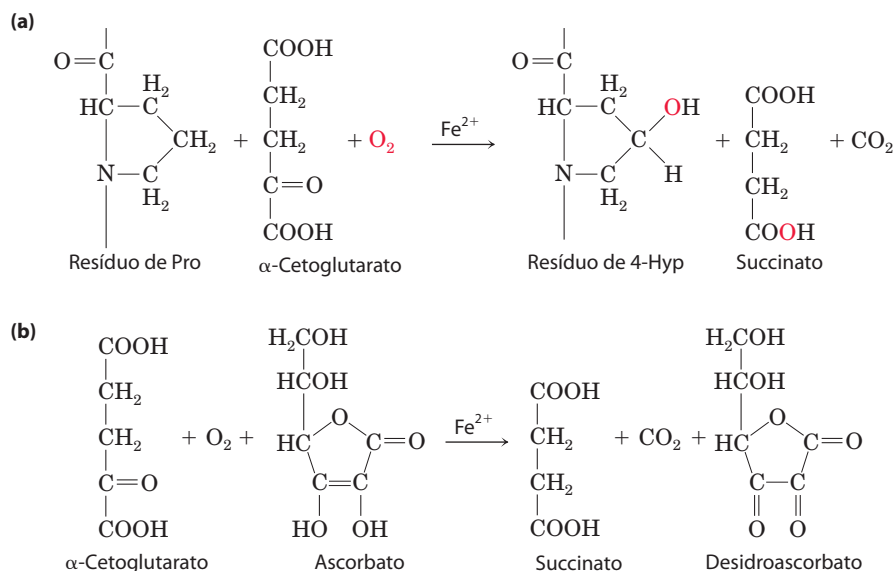
Então, consuma vegetais e frutas frescos.



**FIGURA Q-2** Reações catalisadas pela prolil-4-hidroxilase. **(a)** Reação usual, acoplada à hidroxilação da prolina, que não necessita de ascorbato. O destino dos dois átomos de oxigênio do $O_2$ é mostrado em vermelho. **(b)** Reação não acoplada, na qual o $\alpha$-cetoglutarato sofre descarboxilação oxidativa sem a hidroxilação da prolina. O ascorbato é consumido estequiometricamente neste processo, à medida que é convertido a desidroascorbato, prevenindo a oxidação do $Fe^{2+}$.

O empacotamento compacto das cadeias $\alpha$ na hélice tripla de colágeno garante uma resistência elástica maior do que aquela de uma barra de aço de mesma secção transversal. As fibrilas de colágeno (**Figura 4-13**) são conjuntos de estruturas supramoleculares formados por triplas hélices de moléculas de colágeno (algumas vezes chamadas de moléculas de tropocolágeno) associadas em uma grande variedade de formas para garantir diferentes graus de resistência elástica. As cadeias $\alpha$ e as fibrilas das moléculas de colágeno são interligadas por tipos incomuns de ligações covalentes envolvendo Lys, HyLys (5-hidroxilisina; ver Figura 3-8a), ou resíduos His presentes em algumas posições X e Y. Essas ligações criam resíduos de aminoácidos incomuns, como o desidro-hidroxilisinonorleucina. O caráter cada vez mais rígido e quebradiço do tecido conectivo envelhecido resulta do acúmulo de ligações covalentes transversais nas fibrilas de colágeno.

H—N / O=C —CH—$CH_2$—$CH_2$—$CH_2$—CH=N—$CH_2$—CH(OH)—$CH_2$—$CH_2$—CH— N—H / C=O

Cadeia polipeptídica | Resíduo de Lys sem o grupo $\varepsilon$-amino (norleucina) | Resíduo HyLys | Cadeia polipeptídica

Desidro-hidroxilisinonorleucina

**FIGURA 4-13 Estrutura das fibrilas de colágeno.** O colágeno ($M_r$ 300.000) é uma molécula em forma de bastão, com cerca de 3.000 Å de comprimento e apenas 15 Å de largura. Suas três cadeias $\alpha$ helicoidais entrelaçadas podem ter sequências diferentes; cada cadeia tem aproximadamente 1.000 resíduos de aminoácidos. As fibrilas são feitas de moléculas de colágeno alinhadas de forma escalonada e com ligações cruzadas que garantem resistência. O alinhamento específico e o grau de ligações transversais variam com o tecido e formam estrias transversais características, vistas por microscopia eletrônica. No exemplo mostrado aqui, o alinhamento dos grupos iniciais de cada quatro moléculas produz estrias distantes 640 Å (64 nm) umas das outras.

Um mamífero tem mais de 30 variantes estruturais de colágeno, específicas para cada tecido e diferentes em sequência e função. Alguns defeitos genéticos na estrutura do colágeno em humanos ilustram a estreita relação entre a sequência de aminoácidos e a estrutura tridimensional nesta proteína. A osteogênese imperfeita é caracterizada pela formação anormal dos ossos em bebês; pelo menos oito variações dessa condição, em diferentes graus de severidade, ocorrem na população humana. A síndrome de Ehlers-Danlos é caracterizada por articulações soltas, e pelo menos seis variantes ocorrem em humanos. O compositor Niccolò Paganini (1782-1840) era famoso por sua destreza aparentemente impossível de tocar violino. Ele sofria de uma variante da síndrome Ehlers-Danlos que lhe rendeu efetivamente juntas duplas. Algumas variantes podem ser letais, outras causam problemas por toda vida.

Todas as variantes de ambas as condições resultam da substituição de um resíduo de aminoácido com um grupo R volumoso (como Cys ou Ser) por um resíduo de Gly de uma cadeia $\alpha$ em uma ou outra proteína colágena (um resíduo Gly diferente é substituído em cada uma das doenças). Essas substituições de um único resíduo têm um efeito catastrófico na função do colágeno, pois interrompem a repetição de Gly-X-Y, que garante ao colágeno sua estrutura helicoidal única. Dada sua importância na hélice tripla do colágeno (Figura 4-12d), a Gly não pode ser substituída por outro resíduo de aminoácido sem um efeito substancialmente deletério na estrutura do colágeno. ■

**Fibroína da seda** A fibroína, a proteína da seda, é produzida por insetos e aranhas. Suas cadeias polipeptídicas estão predominantemente na conformação $\beta$. A fibroína é rica em resíduos Ala e Gly, permitindo um grande empacotamento das folhas $\beta$ e um arranjo entrelaçado dos grupos R (**Figura 4-14**). A estrutura global é estabilizada por extensivas ligações de hidrogênio entre todas as ligações peptídicas dos polipeptídeos de cada cadeia $\beta$, assim como pela otimização das interações de van der Waals entre as cadeias. A seda não é elástica porque sua conformação $\beta$ já está bem estendida (Figura 4-6). Entretanto, a estrutura é flexível, pois as cadeias estão unidas por inúmeras interações fracas, em vez de ligações covalentes como ligações dissulfeto nas $\alpha$-queratinas.

## A diversidade estrutural reflete a diversidade funcional nas proteínas globulares

Em uma proteína globular, segmentos diferentes das cadeias polipeptídicas (ou de múltiplas cadeias polipeptídicas) se dobram uns sobre os outros, gerando uma forma mais compacta do que a observada para as proteínas fibrosas (**Figura 4-15**). O enovelamento também garante a diversidade estrutural necessária às proteínas para realizar um grande leque de funções biológicas. Proteínas globulares incluem enzimas, proteínas transportadoras, proteínas motoras, proteínas reguladoras, imunoglobulinas e proteínas com muitas outras funções.

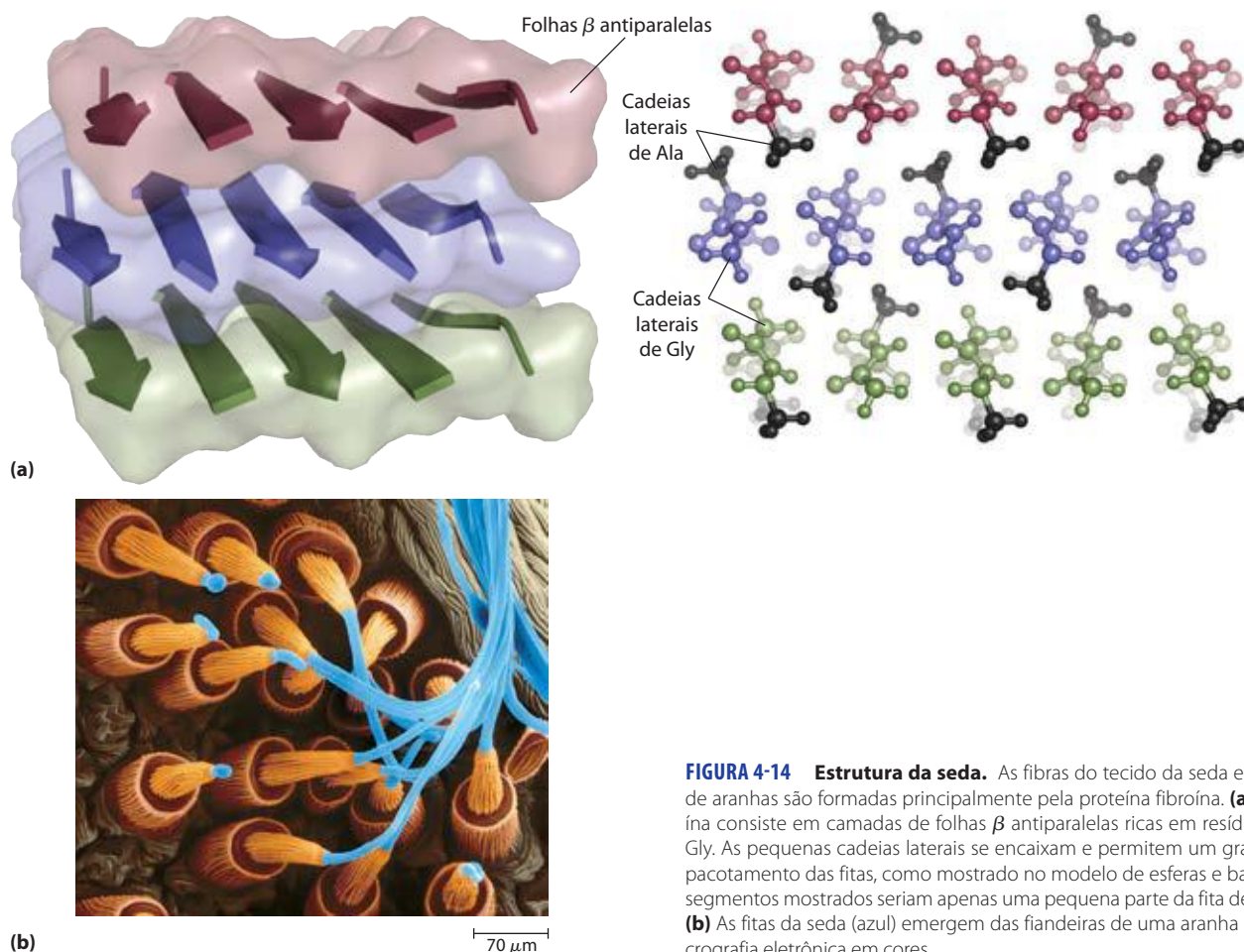



**FIGURA 4-14 Estrutura da seda.** As fibras do tecido da seda e das teias de aranhas são formadas principalmente pela proteína fibroína. **(a)** A fibroína consiste em camadas de folhas $\beta$ antiparalelas ricas em resíduos Ala e Gly. As pequenas cadeias laterais se encaixam e permitem um grande empacotamento das fitas, como mostrado no modelo de esferas e bastões. Os segmentos mostrados seriam apenas uma pequena parte da fita de fibroína. **(b)** As fitas da seda (azul) emergem das fiandeiras de uma aranha nesta micrografia eletrônica em cores.

A presente discussão sobre proteínas globulares começa com os princípios vislumbrados a partir das primeiras estruturas de proteínas elucidadas. Segue-se uma detalhada descrição e classificação comparativa de subestruturas proteicas. Tais discussões são possíveis somente devido à grande quantidade de informações disponíveis na Internet, a partir de bancos de dados públicos, particularmente do Banco de Dados de Proteínas (Quadro 4-4).

Conformação $\beta$
2.000 × 5 Å

Hélice $\alpha$
900 × 11 Å

Forma globular nativa
100 × 60 Å

**FIGURA 4-15 As estruturas proteicas globulares são compactas e variadas.** A albumina sérica humana ($M_r$ 64.500) tem 585 resíduos em uma única cadeia. São dadas aqui as dimensões aproximadas de uma de suas cadeias polipeptídicas se ela ocorresse em uma conformação $\beta$, ou em uma hélice $\alpha$. Também é mostrado o tamanho da proteína em sua forma globular nativa, determinada por cristalografia por raios X; a cadeia polipeptídica deve estar com um enovelamento muito compacto para caber nestas dimensões.

## A mioglobina forneceu os indícios iniciais sobre a complexidade da estrutura globular proteica

**Arquitetura proteica – Estrutura terciária de proteínas globulares pequenas, II. Mioglobina** O primeiro avanço no entendimento da estrutura tridimensional de uma proteína globular veio com os estudos de difração por raios X da mioglobina, feitos por John Kendrew e seus colaboradores, em 1950. A mioglobina é uma proteína ligadora de oxigênio relativamente pequena ($M_r$ 16.700) das células musculares. Ela funciona tanto para a estocagem de oxigênio quanto para facilitar a difusão do oxigênio nos tecidos musculares em contração. A mioglobina contém uma única cadeia polipeptídica de 153 resíduos de aminoácidos de sequência conhecida e um único grupo ferro-protoporfirina, ou heme. O mesmo grupo heme encontrado na mioglobina é encontrado na hemoglobina, a proteína ligadora de oxigênio dos eritrócitos, sendo responsável pela coloração vermelha amarronzada tanto da mioglobina quanto da hemoglobina. A mioglobina é particularmente abundante nos músculos de mamíferos mergulhadores, como as baleias, as focas e os botos – tão abundante que os músculos destes animais são marrons. A estocagem e a distribuição do oxigênio pela mioglobina do músculo permitem que animais que mergulham permaneçam submersos por um longo período. As

## QUADRO 4-4 O banco de dados de proteínas

Atualmente, o número de estruturas proteicas tridimensionais conhecidas está na casa das dezenas de milhares e mais do que dobra a cada dois anos. Essa abundância de informações está revolucionando o entendimento sobre a estrutura de proteínas, a relação estrutura-atividade e as rotas evolutivas pelas quais as proteínas chegaram ao seu estado atual, que podem ser vistas nas semelhanças que aparecem entre as famílias à medida que os bancos de dados de proteínas são examinados e classificados. Um dos recursos mais importantes disponíveis aos bioquímicos é o **Protein Data Bank** (**PDB**, ou banco de dados de proteínas; www.pdb.org).

O PDB é um arquivo de estruturas tridimensionais de macromoléculas biológicas determinadas experimentalmente, contendo quase todas as estruturas macromoleculares (proteínas, RNA, DNA, etc.) elucidadas até o momento. A cada estrutura é atribuído um código de identificação (um código de quatro caracteres, chamado de PDB ID). Tais identificadores são fornecidos nas legendas das figuras para cada uma das estruturas derivadas do PDB ilustradas nesse texto, de forma que os estudantes e os professores podem explorar essas mesmas estruturas. Os arquivos de dados no PDB descrevem as coordenadas espaciais de cada átomo cuja posição foi determinada (muitas das estruturas catalogadas não estão completas). Arquivos de dados adicionais fornecem informações de como as estruturas foram determinadas e sua precisão. As coordenadas atômicas podem ser convertidas em uma imagem da macromolécula com a ajuda de programas de visualização de estruturas. Os estudantes são incentivados a acessar o PDB e explorar as estruturas usando programas de visualização referenciados no banco de dados. Os arquivos de estruturas macromoleculares também podem ser baixados e explorados em seu computador, usando programas livres, tal como o Jmol.

atividades da mioglobina e de outras moléculas de globina são investigadas em detalhe no Capítulo 5.

A **Figura 4-16** mostra diversas representações estruturais da mioglobina, ilustrando como a cadeia polipeptídica é dobrada nas três dimensões – sua estrutura terciária. O grupo vermelho envolvido pela proteína é o heme. O esqueleto da molécula de mioglobina consiste em oito segmentos de hélices $\alpha$ relativamente retas, interrompidas por dobras, algumas delas sendo voltas $\beta$. A hélice $\alpha$ mais longa tem 23 resíduos de aminoácidos, a mais curta apenas 7. Todas as hélices são voltadas para a direita. Mais de 70% dos resíduos de mioglobina estão nessas regiões $\alpha$-helicoidais. As análises por raios X revelaram a posição precisa de cada um dos grupos R, que preenchem quase todo o espaço dentro da cadeia dobrada, não ocupada por átomos do esqueleto.

Várias conclusões importantes podem ser tiradas a partir da estrutura da mioglobina. As posições das cadeias laterais dos aminoácidos refletem uma estrutura cuja estabilidade é resultante de suas interações hidrofóbicas. A maioria dos grupos R hidrofóbicos está no interior da molécula, escondidos da exposição à água. Exceto dois resíduos, todos os outros grupos R polares estão na superfície externa da molécula e estão hidratados. A molécula de mioglobina é tão compacta que em seu interior só há lugar para quatro moléculas de água. Esse denso núcleo hidrofóbico é típico das proteínas globulares. A fração de espaço ocupado pelos átomos em um líquido orgânico é de 0,4 a 0,6. Em uma proteína globular, essa fração é de cerca de 0,75, comparável com aquela do cristal (em um cristal típico, a fração é de 0,70 a 0,78, próximo do máximo teórico). Nesse ambiente compacto, as interações fracas são fortalecidas e reforçam umas às outras. Por exemplo, as cadeias apolares no núcleo estão tão próximas que as interações de curto alcance do tipo van der Waals têm uma contribuição significativa na estabilização das interações hidrofóbicas.

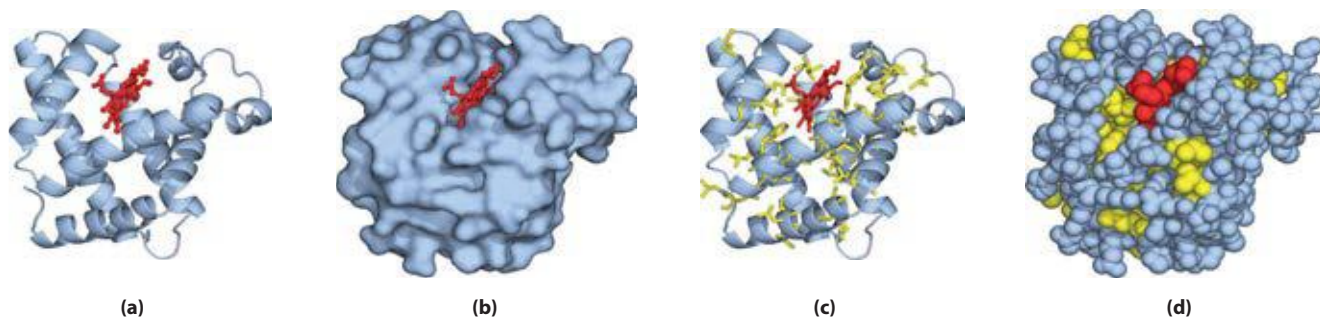



**FIGURA 4-16 Estrutura terciária da mioglobina de cachalote.** (PDB ID 1MBO) A orientação da proteína é igual de (a) a (d); o grupo heme é mostrado em vermelho. Além de ilustrar a estrutura da mioglobina, esta figura mostra exemplos de diversas formas de apresentar a estrutura de uma proteína. **(a)** Esqueleto polipeptídico na representação de fita, introduzido por Jane Richardson, destacando as estruturas secundárias. As regiões de hélice $\alpha$ são evidentes. **(b)** Imagem da superfície da proteína; ela é útil na visualização de fendas, onde outras moléculas podem se ligar à proteína. **(c)** Representação da estrutura em fita, incluindo as cadeias laterais (em amarelo) dos resíduos hidrofóbicos Leu, Ile, Val e Phe. **(d)** Modelo de volume atômico com todas as cadeias laterais dos aminoácidos. Cada átomo está representado por uma esfera que cobre o seu raio de van der Waals. Os resíduos hidrofóbicos são novamente mostrados em amarelo; a maioria está no interior da proteína, e por isso não está visível.

A dedução da estrutura da mioglobina confirmou algumas expectativas e introduziu alguns elementos novos à estrutura secundária. Como predito por Pauling e Corey, todas as ligações peptídicas estão em configuração planar *trans*. As hélices $\alpha$ da mioglobina forneceram a primeira evidência experimental direta da existência desse tipo de estrutura secundária. Três dos quatro resíduos Pro são encontrados em dobras. O quarto resíduo Pro ocorre em uma hélice $\alpha$, onde ele cria uma torção necessária para o firme empacotamento da hélice.

O grupo heme planar repousa sobre uma fenda na molécula de mioglobina. O átomo de ferro no centro do grupo heme apresenta duas posições de ligação (coordenação) perpendiculares ao plano do heme (**Figura 4-17**). Uma delas se liga ao grupo R de um resíduo de His na posição 93; a outra corresponde ao local onde a molécula de $O_2$ se liga. Dentro dessa fenda, a acessibilidade do grupo heme ao solvente é bem restrita. Isso é importante para a função, pois grupos heme livres em uma solução oxigenada são rapidamente oxidados do estado ferroso ($Fe^{2+}$), que é ativo na ligação reversível com o $O_2$, para o estado férrico ($Fe^{3+}$), que não se liga ao $O_2$.

À medida que as diferentes estruturas da mioglobina foram resolvidas, os pesquisadores foram capazes de observar as mudanças estruturais que acompanham a ligação do oxigênio ou de outra molécula, e, assim, pela primeira vez, de entender a correlação entre a estrutura de uma proteína e sua função. Centenas de proteínas são agora submetidas a análises semelhantes. Hoje, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e outras técnicas suplementam os dados de difração de raios X, fornecendo mais informações sobre as estruturas das proteínas (Quadro 4-5). Adicionalmente, o sequenciamento de DNA genômico de muitos organismos (Capítulo 9) identificou milhares de genes que codificam proteínas de sequências conhecidas, mas ainda de função desconhecida; esse trabalho continua a passos largos.

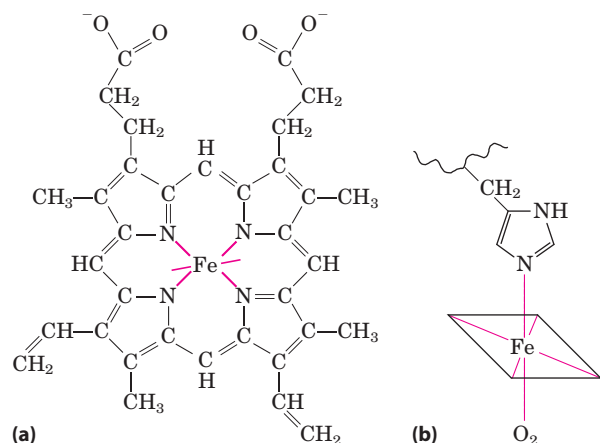



**FIGURA 4-17 O grupo heme.** Este grupo está presente na mioglobina, hemoglobina, citocromos e muitas outras proteínas (as proteínas heme). **(a)** O heme consiste em uma estrutura de anel orgânico complexo, a protoporfirina, que liga um átomo de ferro no seu estado ferroso ($Fe^{2+}$). O átomo de ferro tem seis ligações coordenadas, quatro delas no plano da molécula da porfirina (e ligadas a ela) e duas perpendiculares a ela. **(b)** Na mioglobina e na hemoglobina, uma das ligações perpendiculares está ligada a um átomo de nitrogênio de um resíduo His. A outra está "vaga", servindo de sítio de ligação para a molécula de $O_2$.

## As proteínas globulares têm uma diversidade de estruturas terciárias

A partir do que se sabe sobre estruturas terciárias de centenas de proteínas globulares, é claro que a mioglobina ilustra apenas uma das diversas formas em que a cadeia polipeptídica pode se dobrar. A Tabela 4-4 mostra as proporções de hélices $\alpha$ e conformações $\beta$ (expressas em porcentagem de resíduos em cada um dos tipos) em diversas proteínas globulares pequenas e de cadeia única. Cada uma dessas proteínas tem uma estrutura diferente, adaptada à sua função biológica particular, mas como um todo elas compartilham diversas propriedades importantes com a mioglobina. Cada uma delas está dobrada de forma compacta e, em cada caso, as cadeias laterais hidrofóbicas dos aminoácidos estão orientadas na direção do centro da proteína (longe da água), e suas cadeias laterais hidrofílicas se encontram na superfície. As estruturas também são estabilizadas por inúmeras ligações de hidrogênio e algumas interações iônicas.

Para os estudantes iniciantes, as estruturas terciárias muito complexas das proteínas globulares – algumas muito maiores do que a mioglobina – são mais facilmente acessadas concentrando-se nos padrões estruturais comuns, recorrentes em diferentes proteínas, geralmente não relacionadas. A estrutura tridimensional de uma proteína globular típica pode ser considerada um conjunto de segmentos polipeptídicos em hélices $\alpha$ e conformações $\beta$, ligados por segmentos conectores. A estrutura pode ser, então, definida pela forma como os segmentos estão empilhados uns sobre os outros, e como estão arranjados os segmentos que os conectam.

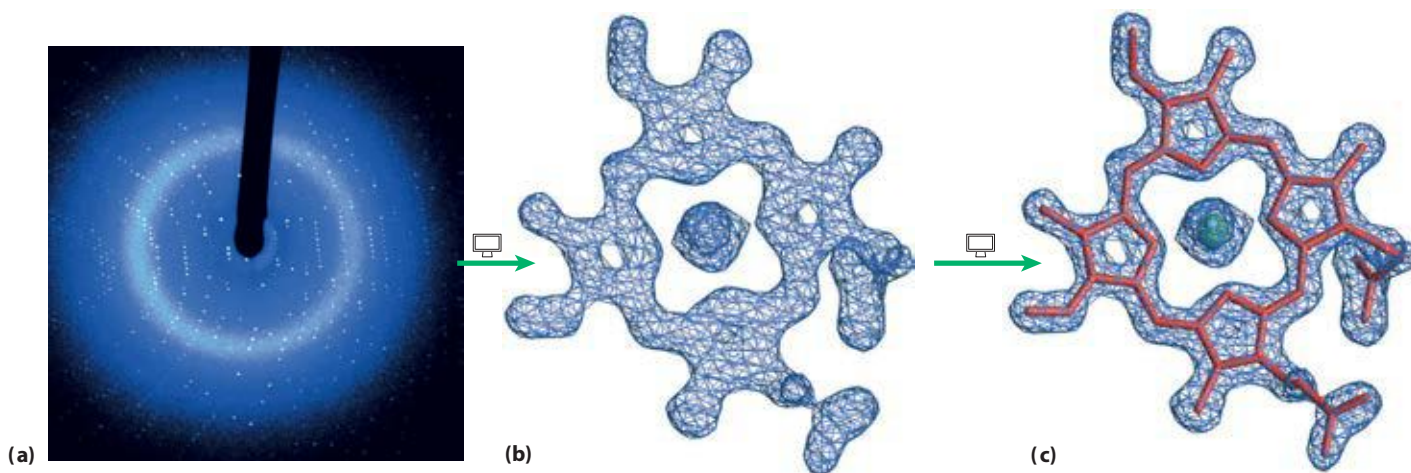
Para entender uma estrutura tridimensional completa, é preciso analisar seu padrão de enovelamento. Primeiro, definem-se dois importantes termos que descrevem os padrões de estruturas de proteínas ou elementos de uma cadeia polipeptídica, seguindo então para as regras de enovelamento.

**TABELA 4-4** Proporção aproximada de hélices $\alpha$ e conformações $\beta$ em algumas proteínas de cadeia única

| | Resíduos (%)* | |
|---|---|---|
| **Proteína (número total de resíduos)** | **Hélice $\alpha$** | **Conformação $\beta$** |
| Quimotripsina (247) | 14 | 45 |
| Ribonuclease (124) | 26 | 35 |
| Carboxipeptidase (307) | 38 | 17 |
| Citocromo *c* (104) | 39 | 0 |
| Lisozima (129) | 40 | 12 |
| Mioglobina (153) | 78 | 0 |

**Fonte**: Dados de Cantor, C.R. e Schimmel, P.R. (1980) *Biophysical Chemistry*, Part I: *The Conformation of Biological Macromolecules*, p. 100, W.H. Freeman and Company, New York.

*As proporções das cadeias polipeptídicas que não fazem parte de hélices $\alpha$ e conformações $\beta$ consistem em curvaturas e espirais irregulares ou regiões estendidas. Segmentos de hélice $\alpha$ e conformação $\beta$ algumas vezes diferem um pouco de suas dimensões e geometrias usuais.

**QUADRO 4-5 MÉTODOS Métodos de determinação da estrutura tridimensional de uma proteína**

**Difração de raios X**

O espaçamento dos átomos em um retículo cristalino pode ser determinado pela medida da localização e da intensidade dos pontos produzidos por um feixe de raios X, de um dado comprimento de onda, em um filme fotográfico, depois desse feixe ser difratado pelos elétrons dos átomos. Por exemplo, a análise por raios X de cristais de cloreto de sódio mostra que os íons $Na^+$ e $Cl^-$ estão dispostos em um arranjo cúbico simples. O espaçamento de diferentes tipos de átomos em moléculas orgânicas complexas, até mesmos as grandes como as proteínas, também pode ser analisado por métodos de difração de raios X. Entretanto, essa técnica de análise de cristais de moléculas complexas é muito mais trabalhosa do que a de cristais de sais simples. Quando o padrão de repetição do cristal é uma molécula tão grande quanto uma proteína, o número de átomos da molécula resulta em milhares de pontos de difração que precisam ser analisados por computador.

Considere como as imagens são geradas em um microscópio óptico. A luz de uma fonte pontual é focalizada em um objeto. O objeto espalha as ondas de luz, e estas ondas espalhadas são reagrupadas por uma série de lentes para gerar uma imagem aumentada do objeto. O tamanho mínimo do objeto cuja estrutura pode ser determinada desta forma – isto é, o poder de resolução do microscópio – é determinado pelo comprimento de onda de luz, neste caso, luz visível, com um comprimento de onda entre 400 e 700 nm. Objetos menores do que a metade do comprimento de onda da luz incidente não têm resolução. Para resolver objetos tão pequenos quanto as proteínas, é necessário usar raios X, com comprimentos de onda na faixa de 0,7 a 1,5 Å (0,07 a 0,15 nm). Entretanto, não há lentes que possam reagrupar os raios X para formar a imagem. Em vez disso, o padrão de difração dos raios X é coletado diretamente, e a imagem é reconstruída por técnicas matemáticas.

A quantidade de informação obtida em uma cristalografia por raios X depende do grau de organização estrutural da amostra. Alguns parâmetros importantes foram obtidos nos primeiros estudos de padrão de difração de proteínas fibrosas arranjadas de forma regular no cabelo e na lã. Entretanto, os feixes ordenados formados pelas proteínas fibrosas não são cristais – as moléculas estão alinhadas lado a lado, mas não estão todas orientadas na mesma direção. Informações estruturais tridimensionais mais detalhadas sobre proteínas necessitam de um cristal de proteína altamente ordenado. As estruturas de muitas proteínas ainda permanecem desconhecidas, simplesmente porque se mostraram difíceis de cristalizar. Os profissionais comparam a preparação de cristais com manter unida uma pilha de bolas de boliche com uma fita de celofane.

Operacionalmente, existem vários passos em uma análise estrutural por raios X (Figura Q-1). Um cristal é colocado em um feixe de raios X, entre a fonte de raios X e o detector, e um conjunto de pontos, chamados de reflexões, é gerado. Os pontos são gerados pela difração do feixe de raios X, e cada átomo da molécula faz uma contribuição para cada ponto. Um mapa de densidade eletrônica da proteína é reconstruído a partir do padrão total de difração, por uma técnica matemática chamada de transformada de Fourier. O computador age, na verdade, como "lente computacional". Um modelo da estrutura é então construído de acordo com o mapa de densidade eletrônica.

John Kendrew verificou que o padrão de difração de raios X da mioglobina cristalina (isolada de músculos do cachalote) é muito complexo, com cerca de 25.000 reflexões. A análise computacional dessas reflexões ocorreu em etapas. A resolução aumentou a cada etapa, até que em 1959 as posições de quase todos os átomos diferentes de hidrogênio foram determinadas. A sequência de aminoácidos da proteína, obtida por análise química, foi consistente com o modelo molecular. A estrutura de milhares de proteínas, a maioria delas mais complexa que a mioglobina, foi desde então determinada com um nível de resolução semelhante.

**FIGURA Q-1** Etapas da determinação da estrutura da mioglobina de cachalote via cristalografia por raios X. **(a)** O padrão da difração por raios X é gerado a partir de um cristal da proteína. **(b)** Os dados obtidos pelo padrão de difração são utilizados para calcular um mapa de densidade eletrônica tridimensional. Somente a densidade eletrônica do heme, uma pequena parte da estrutura, é mostrada aqui. **(c)** As regiões de maior densidade eletrônica revelam a localização do núcleo atômico, esta informação é utilizada para construir a estrutura final. Aqui, a estrutura do heme é modelada em seu mapa de densidade eletrônica. **(d)** A estrutura completa da mioglobina de cachalote, incluindo o heme (PDB ID 2MBW).

É claro que o ambiente físico em um cristal não é idêntico ao ambiente em solução ou em uma célula viva. O cristal impõe uma média temporal e espacial na estrutura deduzida de sua análise, e os estudos de difração de raios X fornecem poucas informações sobre os movimentos moleculares no interior da proteína. A conformação das proteínas em um cristal pode, a princípio, ser afetada por fatores não fisiológicos como contatos proteína-proteína dentro do cristal. Entretanto, quando estruturas derivadas da análise de cristais são comparadas com informações estruturais obtidas de outras formas (como RMN, descrita a seguir), as estruturas derivadas do cristal quase sempre representam a conformação funcional da proteína. A cristalografia por raios X pode ser aplicada com sucesso a proteínas grandes demais para serem estruturalmente analisadas por RMN.

**Ressonância magnética nuclear**

Uma vantagem dos estudos de ressonância magnética nuclear (RMN) é que eles são realizados com as macromoléculas em solução, enquanto a cristalografia é limitada a moléculas que podem ser cristalizadas. A RMN também pode esclarecer o lado dinâmico da estrutura da proteína, incluindo mudanças conformacionais, enovelamento proteico e interação com outras moléculas.

A RMN é a manifestação do momento angular do *spin* nuclear, uma propriedade quântico-mecânica dos núcleos atômicos. Somente alguns átomos, incluindo $^{1}H$, $^{13}C$, $^{15}N$, $^{19}F$ e $^{31}P$, apresentam o tipo de *spin* nuclear que gera sinal na RMN. O *spin* nuclear gera um dipolo magnético. Quando um campo magnético estático e forte é aplicado em uma solução contendo um único tipo de macromolécula, os dipolos magnéticos são alinhados no campo em uma das duas orientações, paralela (baixa energia) ou antiparalela (alta energia). Um pequeno ($\sim$10 $\mu$s) pulso de energia eletromagnética de frequência adequada (a frequência de ressonância, que está dentro da faixa de radiofrequência) é aplicado, em certos ângulos, aos núcleos alinhados no campo magnético. Alguma energia é absorvida à medida que o núcleo muda para o estado de maior energia, e o espectro de absorção resultante contém informações sobre a identidade do núcleo e seu ambiente químico nas imediações. Os dados de diversos desses experimentos com a amostra são reunidos, aumentando a relação sinal-ruído, e é gerado um espectro de RMN, como o da Figura Q-2.

O $^{1}H$ é particularmente importante nos experimentos de RMN, pois é altamente sensível e naturalmente abundante. Para macromoléculas, o espectro de RMN de $^{1}H$ pode ser bem complicado. Até mesmo uma pequena proteína pode conter centenas de átomos de $^{1}H$, normalmente gerando um espectro de RMN unidimensional muito complexo para ser analisado. A análise estrutural de proteínas se tornou possível com o advento das técnicas de RMN bidimensionais (Figura Q-3). Esses métodos permitem a medida do acoplamento, dependente da distância, dos *spins* nucleares de átomos espacialmente próximos (o efeito Overhauser nuclear [NOE], em um método chamado de NOESY) ou o acoplamento dos *spins* nucleares de átomos conectados por ligações covalentes (espectroscopia de correlação total, ou TOCSY).

A tradução de um espectro de RMN bidimensional em uma estrutura tridimensional completa é um processo muito trabalhoso. Os sinais de NOE fornecem algumas informações sobre as distâncias entre cada um dos áto-

*(Continua na próxima página)*

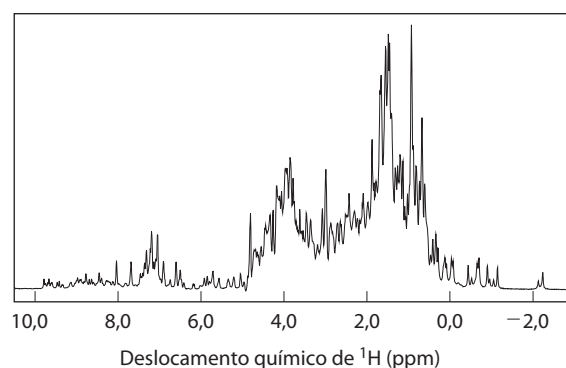



**FIGURA Q-2** Espectro de RMN unidimensional da globina do verme-de-sangue marinho (*Glycera* sp.). Esta proteína e a mioglobina de cachalote são análogos estruturais muito próximos, pertencendo à mesma família estrutural e compartilhando a função de transporte de oxigênio.

**QUADRO 4-5 MÉTODOS Métodos de determinação da estrutura tridimensional de uma proteína (*Continuação*)**

mos, mas para esses valores de distâncias serem úteis, os átomos que originam cada sinal devem ser identificados. Os experimentos complementares de TOCSY podem ajudar na identificação de quais sinais de NOE refletem átomos que estão ligados por ligações covalentes. Certos padrões de sinais de NOE têm sido associados com estruturas secundárias como hélices $\alpha$. A engenharia genética (Capítulo 9) pode ser usada para preparar proteínas que contenham isótopos raros como $^{13}C$ ou $^{15}N$. Os novos sinais de RMN produzidos por esses átomos e o acoplamento com os sinais de $^{1}H$ resultantes dessa substituição auxiliam na designação de cada um dos sinais de $^{1}H$ NOE. O processo também é facilitado pelo conhecimento da sequência do polipeptídeo.

Para gerar a representação de uma estrutura tridimensional, os pesquisadores colocam em um computador as restrições de distância, junto com as restrições geométricas conhecidas como quiralidade, raios de van der Waals e distância e ângulo de ligação. O computador gera, então, um conjunto de estruturas altamente relacionadas que representa um conjunto de conformações consistentes com os valores observados no NOE (Figura Q-3c). A incerteza das estruturas geradas por RMN é em parte um reflexo das vibrações moleculares dentro de uma proteína, discutidas em mais detalhes no Capítulo 5. O erro experimental normal também influi.

As estruturas proteicas determinadas tanto por cristalografia por raios X quanto por RMN geralmente são bem coincidentes. Em alguns casos, a localização exata de algumas cadeias laterais de aminoácidos específicos da superfície da proteína é diferente, normalmente devido aos efeitos relacionados com o empacotamento entre proteínas adjacentes no cristal. Juntas, as duas técnicas são as responsáveis pelo rápido aumento da disponibilidade de informações estruturais sobre as macromoléculas de células vivas.

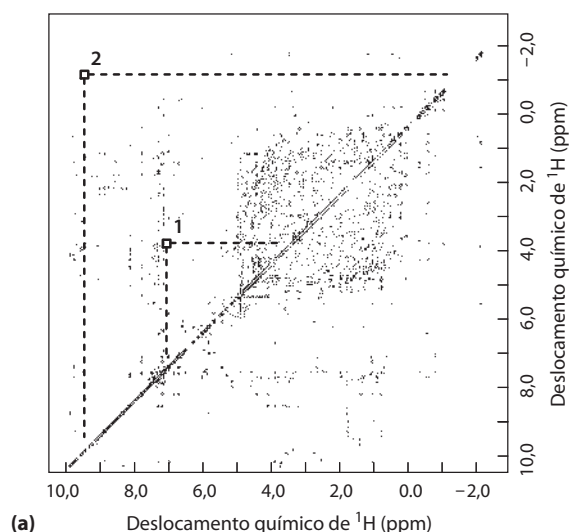
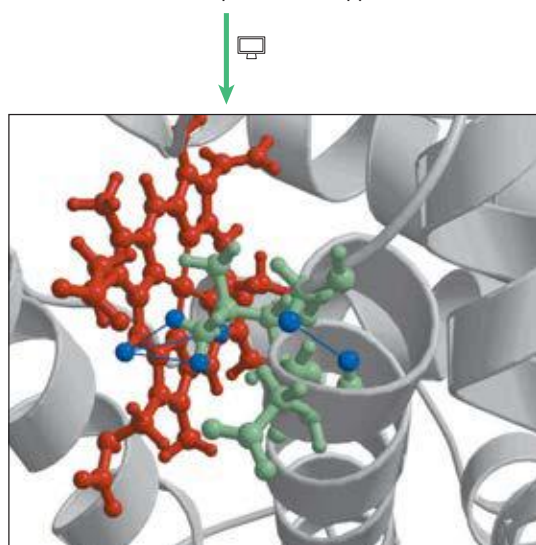
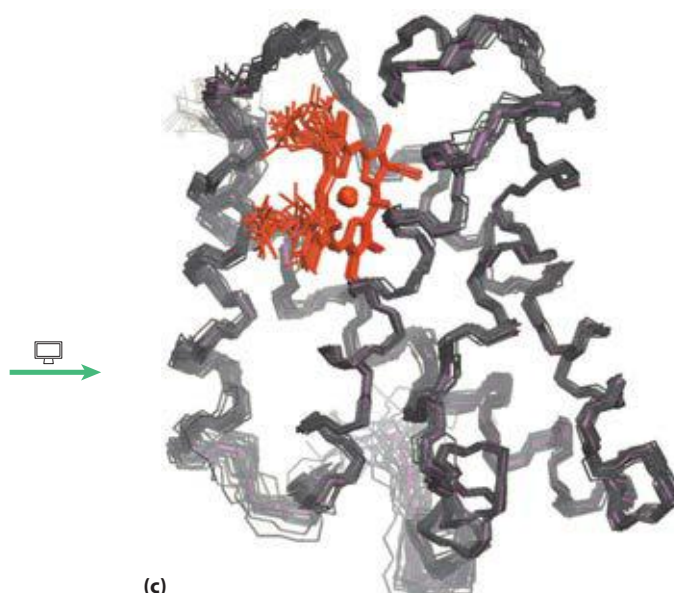



**FIGURA Q-3** Uso de RMN bidimensional para determinar a estrutura tridimensional da globina, a mesma proteína usada para gerar os dados da Figura Q-2. A diagonal em um espectro de RMN bidimensional é equivalente ao espectro unidimensional. Os picos fora da diagonal são sinais de NOE gerados pelas interações de curto alcance dos átomos de $^{1}H$, que podem gerar sinais bem distantes em um espectro unidimensional. Duas destas interações são identificadas em **(a)** e suas identidades estão mostradas em linhas azuis em **(b)** (PDB ID 1VRF). São desenhadas três linhas para a interação 2 entre um grupo metil da proteína e um hidrogênio do heme. O grupo metil gira rapidamente de forma que cada um dos seus três hidrogênios contribui igualmente para a interação e para o sinal de RMN. Tal informação é usada para determinar a estrutura tridimensional completa (PDB ID 1VRE), como em **(c)**. As múltiplas linhas que mostram o esqueleto da proteína em (c) representam o conjunto de estruturas consistentes com os dados de distância da RMN. A semelhança estrutural com a mioglobina (Figura Q-1) é evidente. As proteínas estão orientadas da mesma forma nas duas figuras.

O primeiro termo é **motivo**, também chamado de **estrutura supersecundária** ou **enovelamento**. *Um motivo ou enovelamento é um padrão de enovelamento identificável, envolvendo dois ou mais elementos da estrutura secundária e a conexão (ou conexões) entre eles.* Um motivo pode ser muito simples, tal como dois elementos de estrutura secundária dobrados um sobre o outro e representa apenas uma pequena parte de uma proteína. Um exemplo é uma **alça $\beta$-$\alpha$-$\beta$** (**Figura 4-18a**). Um motivo também pode ter uma estrutura bem elaborada, envolvendo um grande número de segmentos proteicos dobrados juntos, como o barril $\beta$ (Figura 4-18b). Em alguns casos, um único e grande motivo pode abranger toda a proteína. Os termos "motivo" e "enovelamento" são frequentemente usados como sinônimos, embora "enovelamento" seja mais comumente aplicado aos padrões de enovelamento ligeiramente mais complexos. Os termos incluem qualquer padrão favorável de enovelamento, sendo útil na descrição desses padrões. O segmento definido como um motivo pode, ou não, ser estável independentemente. Já foi mencionado um motivo bem estudado, a espiral enrolada da estrutura da $\alpha$-queratina, também encontrado em outras proteínas. O arranjo característico de oito hélices $\alpha$ na mioglobina é reproduzido em todas as globinas e é chamado de enovelamento de globina. Observe que um motivo não é um elemento estrutural hierárquico que fica entre a estrutura secundária e a terciária. Ele é simplesmente um padrão de enovelamento. O termo sinônimo "estrutura supersecundária" pode, portanto, causar confusão, pois sugere uma hierarquia.

O segundo termo que descreve padrões estruturais é o **domínio**. Um domínio, como definido por Jane Richardson em 1981, é uma parte da cadeia polipeptídica que é independentemente estável ou pode se movimentar como uma entidade isolada em relação ao resto da proteína. Polipeptídeos com mais de algumas centenas de resíduos de aminoácidos normalmente se dobram em dois ou mais domínios, algumas vezes com diferentes funções. Muitas vezes, um domínio de uma proteína grande irá conservar sua estrutura tridimensional nativa mesmo quando separado (p. ex., por uma clivagem proteolítica) do resto da cadeia polipeptídica. Em uma proteína com múltiplos domínios, cada um

**FIGURA 4-18** **Motivos estruturais. (a)** Um motivo simples, a alça $\beta$-$\alpha$-$\beta$. **(b)** Um motivo mais elaborado, o barril $\beta$. Este barril $\beta$ é o único domínio da $\alpha$-hemolisina (toxina que mata a célula, criando um orifício em sua membrana) da bactéria *Staphylococcus aureus* (derivada do PDB ID 7AHL).

**FIGURA 4-19** **Domínios estruturais do polipeptídeo troponina C.** (PDB ID 4TNC) Esta proteína ligadora de cálcio encontrada no músculo tem dois domínios ligadores de cálcio separados, mostrados aqui em marrom e em azul.

deles pode aparecer como uma porção globular diferente (**Figura 4-19**); mais frequentemente, extensos contatos entre os domínios tornam difícil o discernimento entre eles. Domínios diferentes em geral têm funções diferentes, como a ligação de pequenas moléculas ou interação com outras proteínas. Proteínas pequenas normalmente têm somente um domínio (o domínio *é* a proteína).

O enovelamento dos polipeptídeos é sujeito a uma série de limitações físicas e químicas, e várias regras foram propostas a partir de estudos de padrões comuns de enovelamento proteico.

1. As interações hidrofóbicas dão uma grande contribuição para a estabilidade da estrutura de proteínas. O ocultamento dos grupos R dos aminoácidos hidrofóbicos, de modo a excluir a água, necessita de pelo menos duas camadas de estrutura secundária. Motivos simples como a alça $\beta$-$\alpha$-$\beta$ (Figura 4-18a) criam essas camadas.
2. Quando ocorrem juntas em uma proteína, as hélices $\alpha$ e as folhas $\beta$ geralmente são encontradas em camadas estruturais diferentes. Isso porque o segmento do esqueleto polipeptídico em conformação $\beta$ (Figura 4-6) não faz, com facilidade, ligações de hidrogênio com uma hélice $\alpha$ adjacente a ele.
3. Segmentos adjacentes na sequência de aminoácidos normalmente se posicionam de forma adjacente na estrutura dobrada. Segmentos distantes do polipeptídeo podem se aproximar na estrutura terciária, mas não é a regra.
4. A conformação $\beta$ é mais estável quando os segmentos individuais são levemente torcidos para a direita. Isso influencia tanto o arranjo das folhas $\beta$ derivado dos segmentos supertorcidos quanto a forma da conexão do polipeptídeo entre elas. Duas folhas $\beta$ paralelas, por exemplo, devem ser conectadas por uma fita cruzada (**Figura 4-20a**). Em princípio, essa fita pode ter uma conformação no sentido horário ou anti-horário, mas em proteínas o mais comum é no sentido horário. As conexões voltadas para a direita tendem a ser mais curtas do que as conexões voltadas para esquerda, e tendem a dobrar-se com um ângulo menor, o que as torna mais fáceis de serem formadas. A torção de folhas

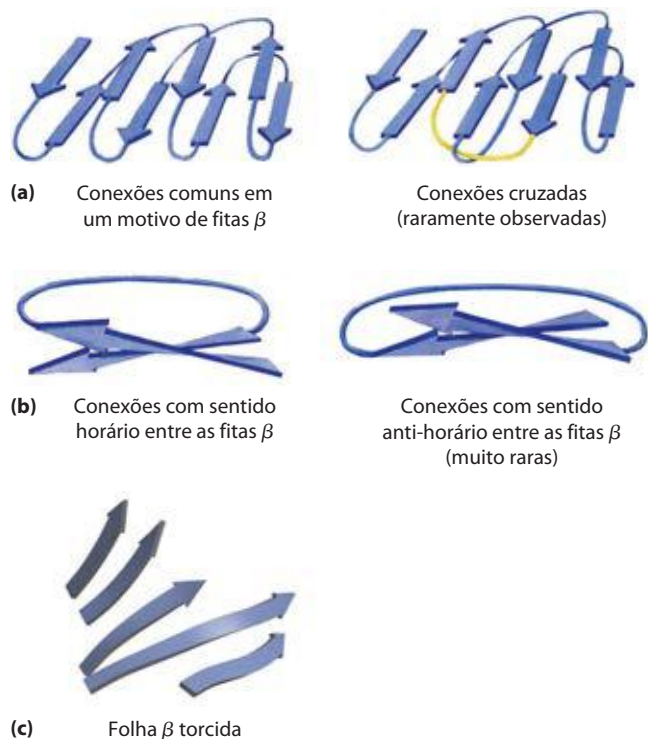



**FIGURA 4-20 Padrões de enovelamento estável em proteínas. (a)** Conexões entre fitas $\beta$ em arranjos de folhas $\beta$. As fitas aqui são visualizadas a partir de uma extremidade, sem torção. As linhas mais grossas representam as conexões nas extremidades mais próximas do observador; as linhas mais finas representam as conexões nas extremidades mais distantes das fitas $\beta$. As conexões em uma das extremidades (p. ex., aquelas próximas ao observador) raramente se cruzam umas com as outras. Um exemplo de tal cruzamento raro está ilustrado na fita amarela da estrutura a direita. **(b)** Devido à torção para a direita nas fitas $\beta$, as conexões entre as fitas em geral são no sentido horário. As conexões no sentido anti-horário devem assumir ângulos mais agudos e são mais difíceis de serem formadas. **(c)** Esta folha $\beta$ torcida pertence a um domínio da fotoliase (proteína que repara certos tipos de danos ao DNA) de *E. coli* (derivado do PDB ID 1DNP). As alças de conexão foram removidas para que se foque no enovelamento da folha $\beta$.

$\beta$ também resulta em uma torção característica das estruturas formadas por vários desses segmentos, como pode ser observado no barril $\beta$ (Figura 4-18b) e na folha $\beta$ torcida (Figura 4-20c), que forma o núcleo de várias estruturas maiores.

Seguindo essas regras, motivos complexos podem ser construídos a partir daqueles mais simples. Por exemplo, uma série de alças $\beta$-$\alpha$-$\beta$ arranjadas de tal forma que as fitas $\beta$ de um barril formem um motivo particularmente comum e estável, o **barril $\alpha/\beta$** (**Figura 4-21**). Nessa estrutura, cada segmento $\beta$ paralelo é conectado ao seu vizinho por um segmento $\alpha$-helicoidal. Todas as conexões são voltadas para direita. O barril $\alpha/\beta$ é encontrado em diversas enzimas, geralmente com um sítio de ligação (de um cofator ou substrato) na forma de uma fenda próxima a uma das extremidades do barril. Observe que domínios com padrão semelhante de enovelamento são ditos ter o mesmo motivo, mesmo que suas hélices $\alpha$ e fitas $\beta$ constituintes possam diferir em tamanho.

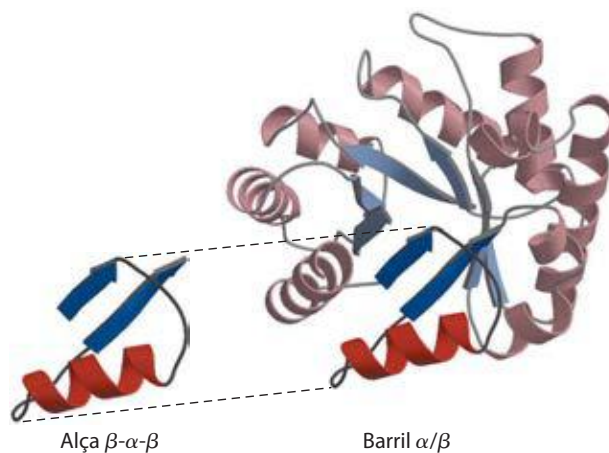



**FIGURA 4-21 A construção de domínios maiores a partir dos menores.** O barril $\alpha/\beta$ é um domínio que ocorre comumente, sendo formado por repetições do motivo alça $\beta$-$\alpha$-$\beta$. Este barril $\alpha/\beta$ é um domínio da piruvato-cinase (enzima glicolítica) de coelho (derivada do PDB ID 1PKN).

## Motivos de proteínas são as bases da classificação estrutural

**Arquitetura proteica – Estrutura terciária de proteínas globulares grandes, IV. Classificação estrutural das proteínas.** Como se vê, a compreensão da complexidade da estrutura terciária é facilitada pela consideração das subestruturas. Seguindo essa ideia, os pesquisadores organizaram o conteúdo completo de bancos de dados proteicos, de acordo com uma hierarquia dos níveis estruturais. Todos esses bancos de dados se baseiam nos dados e nas informações depositados no Protein Data Bank (PDB, Banco de Dados de Proteínas). O banco de dados Structural Classification of Proteins (SCOP, ou Classificação Estrutural de Proteínas) é um bom exemplo desta importante tendência na bioquímica. No mais alto nível de classificação, o banco de dados SCOP (http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop) utiliza um esquema já em uso, com quatro classes de estruturas de proteínas: **toda $\alpha$**, **toda $\beta$**, **$\alpha/\beta$** (com segmentos $\alpha$ e $\beta$ intercalados ou alternados) e **$\alpha$ + $\beta$** (com regiões $\alpha$ e $\beta$ um pouco separadas). Cada classe inclui dezenas a centenas de diferentes combinações de enovelamentos (motivos), construídas a partir de subestruturas gradativamente identificáveis. Alguns desses arranjos subestruturais são bem comuns, outros foram encontrados em apenas uma proteína. A **Figura 4-22** mostra a variedade desses motivos distribuídos entre as quatro classes de estrutura de proteínas. Essa é apenas uma pequena amostra das centenas de motivos conhecidos. Entretanto, o número de padrões de enovelamento não é infinito. À medida que a velocidade na qual novas estruturas de proteínas são elucidadas, a fração dessas estruturas que contêm novos motivos tem diminuído. Ao todo, devem existir menos de 1.000 motivos diferentes. A Figura 4-22 também mostra como as proteínas podem ser organizadas em função da presença dos vários motivos. Os níveis de organização mais superiores, **classe** e **enovelamento**, são puramente estruturais. Abaixo do nível de enovelamento (ver o código de cores na Figura 4-22), a classificação tem como base as relações evolutivas.

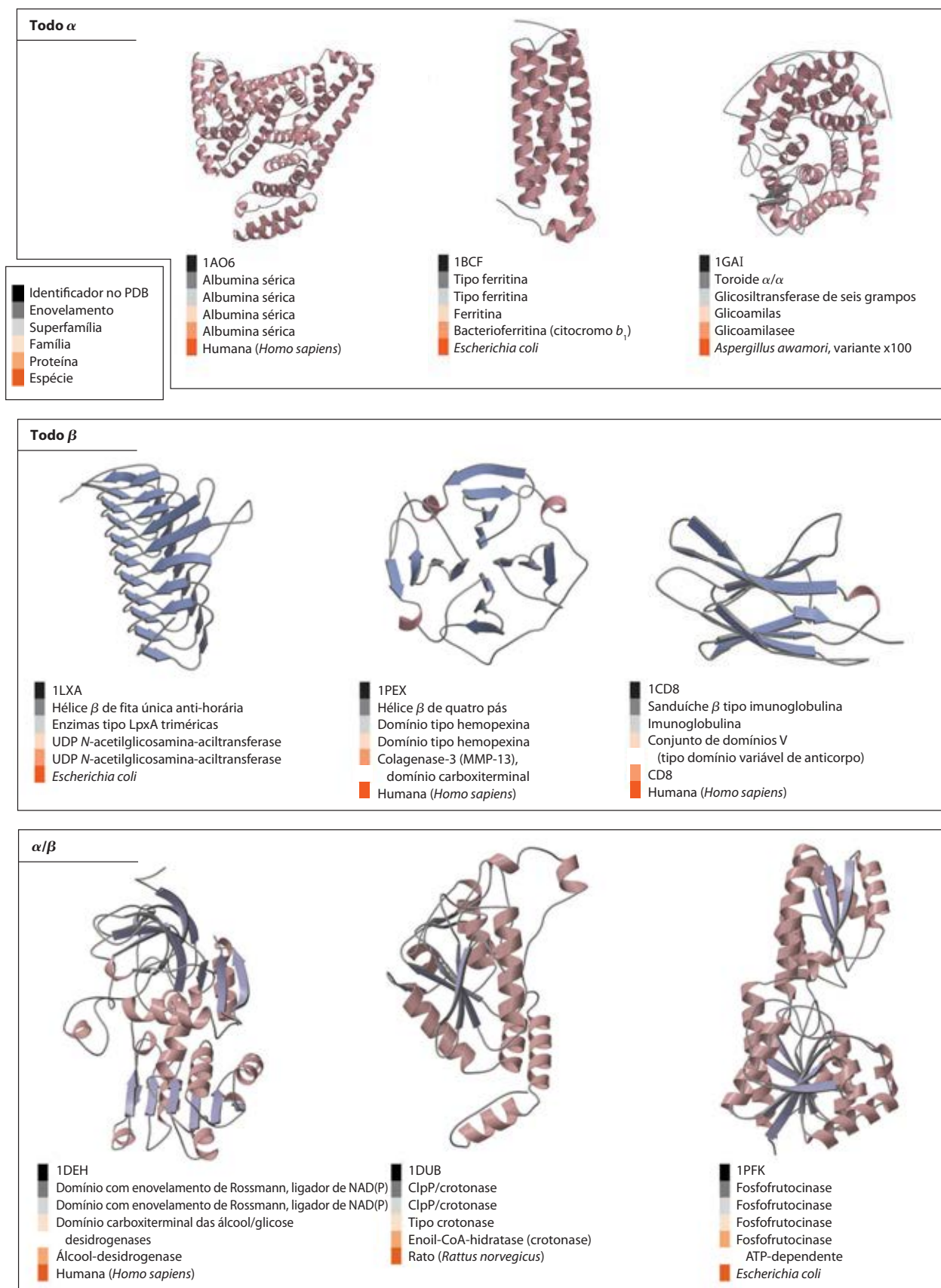



**FIGURA 4-22 Organização das proteínas com base nos motivos.** Mostrados aqui estão apenas alguns das centenas de motivos estáveis conhecidos, divididos em quatro classes: todo $\alpha$, todo $\beta$, $\alpha/\beta$ e $\alpha + \beta$. Os dados de classificação estrutural do banco de dados SCOP (Structural Classification of Proteins, http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop) também são fornecidos (ver código de cores). O identificador no PDB (listado inicialmente para cada estrutura) corresponde ao código único de acesso de cada estrutura depositada no Protein Data Bank (www.pdb.org). O barril $\alpha/\beta$ (ver Figura 4-21) é outro motivo $\alpha/\beta$ particularmente comum. ***(Continua na próxima página)***

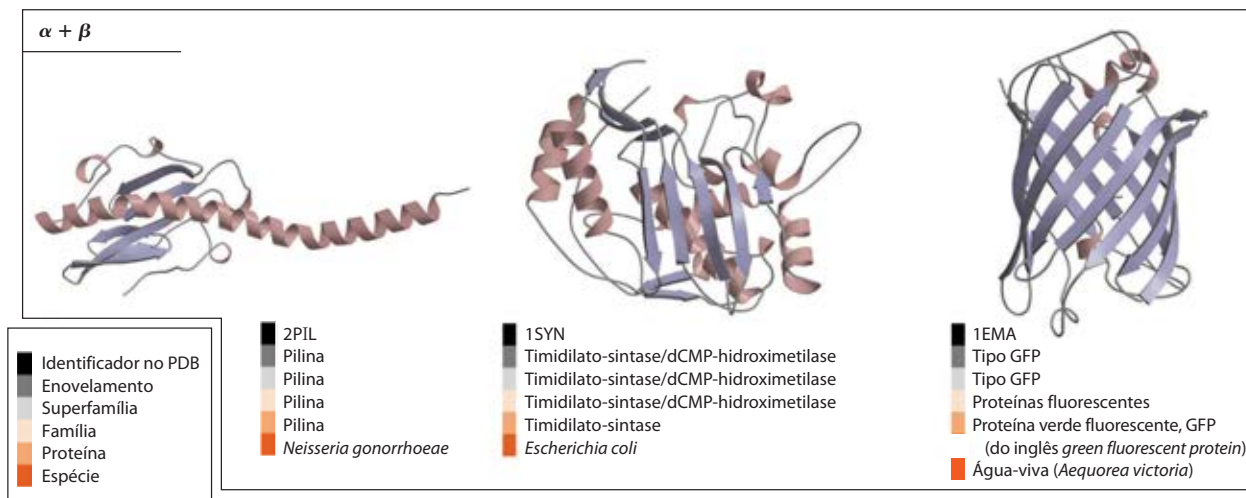



**FIGURA 4-22** ***(Continuação)***

Vários exemplos de domínios recorrentes ou motivos estruturais estão disponíveis, revelando que a estrutura terciária das proteínas é mais conservada do que suas sequências de aminoácidos. A comparação entre as estruturas de proteínas pode, então, fornecer muita informação sobre sua evolução. Proteínas com significativa semelhança na estrutura primária e/ou com estrutura terciária e funções semelhantes fazem parte de uma mesma **família proteica**. Uma relação evolutiva forte normalmente é evidente em uma família de proteínas. Por exemplo, a família globina apresenta muitas proteínas diferentes com similaridade estrutural e de sequência com a mioglobina (como visto nas proteínas usadas nos exemplos do Quadro 4-5 e no Capítulo 5). Duas ou mais famílias com pouca similaridade na sequência de aminoácidos algumas vezes utilizam o mesmo motivo estrutural geral e apresentam semelhanças funcionais; essas famílias são agrupadas como **superfamílias**. Uma relação evolutiva entre as famílias em uma superfamília é considerada provável, ainda que as diferenças temporais e funcionais – resultantes de diferentes pressões adaptativas – possam ter suprimido muitas das relações reveladoras entre sequências. Uma família de proteínas pode estar distribuída em todos os três domínios de vida celular: Bacteria, Archaea e Eukarya, sugerindo uma origem remota. Muitas proteínas envolvidas no metabolismo intermediário e no metabolismo dos ácidos nucleicos e proteínas se encaixam nessa categoria. Outras famílias podem estar presentes somente em um pequeno grupo de organismos, indicando que aquela estrutura surgiu mais recentemente. Rastrear a história natural dos motivos estruturais, usando as classificações estruturais de bancos de dados como o SCOP, fornece um grande complemento às análises de sequência na investigação da relação evolutiva. O banco de dados SCOP é manualmente gerenciado, com o objetivo de colocar as proteínas na sua rede evolutiva correta, com base nas características estruturais conservadas.

Motivos estruturais se tornaram especialmente importantes na definição de famílias e superfamílias de proteínas. Sistemas aperfeiçoados de classificação e elucidação de proteínas inevitavelmente levaram à elucidação de novas relações funcionais. Dada a importância das proteínas nos sistemas vivos, essas comparações estruturais podem ajudar no esclarecimento de todos os aspectos da bioquímica, da evolução de proteínas individuais até a história evolutiva de rotas metabólicas completas.

## A estrutura quaternária varia de dímeros simples a grandes complexos

**Arquitetura proteica – Estrutura quaternária** Muitas proteínas têm múltiplas subunidades polipeptídicas (de duas a centenas). A associação das cadeias polipeptídicas pode servir a uma variedade de funções. Muitas proteínas com múltiplas subunidades podem ter funções reguladoras; a ligação de pequenas moléculas pode afetar a interação entre as subunidades, causando grandes mudanças na atividade da proteína em resposta a pequenas mudanças na concentração de substrato ou moléculas reguladoras (Capítulo 6). Em outros casos, subunidades distintas assumem funções diferentes, mas relacionadas, como catálise e regulação. Algumas associações, como nas proteínas fibrosas consideradas anteriormente neste capítulo e nas proteínas dos capsídeos dos vírus, têm, principalmente, funções estruturais. Algumas associações proteicas muito grandes formam sítios de reações complexas envolvendo múltiplas etapas. Por exemplo, cada ribossomo, o local onde ocorre a síntese de proteínas, incorpora dúzias de subunidades de proteínas com certo número de moléculas de RNA.

Uma proteína de múltiplas subunidades também é chamada de **multímero**. Um multímero com apenas algumas subunidades é chamado de **oligômero**. Se um multímero apresenta subunidades não idênticas, a estrutura total da proteína pode ser assimétrica e bem complicada. Entretanto, a maioria dos multímeros apresenta subunidades idênticas, ou grupos de subunidades não idênticas que se repetem, geralmente em arranjos simétricos. Como apresentado no Capítulo 3, as unidades estruturais de repetição em uma proteína multimérica, tanto de um único tipo de subunidade quanto de um grupo de subunidades, são chamadas de **protômero**. Muitas vezes são utilizadas letras gregas para distinguir as diferentes subunidades que fazem parte do protômero.

A primeira proteína oligomérica que teve sua estrutura tridimensional determinada foi a hemoglobina ($M_r$ 64.500), que contém quatro cadeias polipeptídicas e quatro grupos prostéticos heme, nos quais os átomos de ferro se apresentam no estado ferroso ($Fe^{2+}$) (Figura 4-17). A porção proteica, a globina, consiste em duas cadeias (141 resíduos em cada cadeia $\alpha$) e duas cadeias $\beta$ (146 resíduos em cada cadeia). Observe que neste caso, $\alpha$ e $\beta$ não se referem às estruturas secundárias. Em uma prática, que pode ser confusa para o aluno iniciante, as letras gregas $\alpha$ e $\beta$ ($\gamma$ e $\delta$, e outras) são frequentemente usadas para distinguir dois tipos diferentes de subunidades em uma proteína com múltiplas subunidades, independentemente de quais tipos de estruturas secundárias podem predominar nas subunidades. Como a hemoglobina é quatro vezes maior do que a mioglobina, foi necessário muito mais tempo e esforço para resolver sua estrutura tridimensional por análise de raios X, o que foi finalmente obtido por Max Perutz, John Kendrew e seus colegas, em 1959. As subunidades da hemoglobina estão organizadas em pares simétricos (**Figura 4-23**). Cada par tem uma subunidade $\alpha$ e uma subunidade $\beta$. A hemoglobina pode, portanto, ser descrita tanto como tetrâmero quanto dímero de protômeros $\alpha\beta$. O papel dessas subunidades distintas na função da hemoglobina é amplamente discutido no Capítulo 5.

Max Perutz, 1914–2002 (esquerda) e John Kendrew, 1917–1997

## Algumas proteínas ou segmentos proteicos são intrinsecamente desordenados

Apesar de décadas de progresso no entendimento da estrutura proteica, muitas proteínas não podem ser cristalizadas, tornando difícil a determinação de suas estruturas tridimensionais por métodos considerados clássicos (ver Quadro 4-5). Mesmo quando cristalizadas, partes da proteína estão suficientemente desordenadas no cristal de forma que a estrutura determinada não inclui essas partes. Algumas vezes, isso se deve a características sutis da estrutura que tornam a cristalização difícil. No entanto, a razão pode ser mais simples: algumas proteínas ou segmentos proteicos carecem de estruturas ordenadas em solução.

O conceito de que algumas proteínas funcionam na ausência de uma estrutura definida é um produto da reavaliação dos dados envolvendo muitas proteínas diferentes. Um terço de todas as proteínas humanas pode ser desestruturado ou possuem segmentos desestruturados significativos. Todos os organismos possuem algumas proteínas que se encaixam nessa categoria. As **proteínas intrinsecamente desordenadas** têm propriedades distintas das proteínas estruturadas clássicas. Elas carecem de um núcleo hidrofóbico e, ao contrário, são caracterizadas por alta densidade de aminoácidos carregados, como Lys, Arg e Glu. Resíduos de Pro também são proeminentes, já que eles tendem a romper estruturas ordenadas.

A desordem estrutural e a alta densidade de cargas podem facilitar a atividade de algumas proteínas, como espaçadores, isoladores ou elementos de ligação em estruturas maiores. Outras proteínas desordenadas são sequestradoras, ligando íons e moléculas pequenas em solução e servindo de reservatórios ou depósitos de lixo. No entanto, muitas proteínas intrinsecamente desordenadas são o núcleo de importantes redes de interações proteicas. A falta de uma estrutura ordenada pode facilitar um tipo de promiscuidade funcional, permitindo a interação de uma proteína com múltiplos parceiros. Algumas proteínas intrinsecamente desordenadas atuam por inibir a atividade de outras proteínas por um mecanismo não usual: por envolver-se em torno de suas proteínas-alvo. Uma proteína desordenada pode ter algumas ou mesmo dúzias de proteínas parceiras. A desordem estrutural permite ao inibidor proteico se envolver em torno de múltiplos alvos de diferentes formas. A proteína

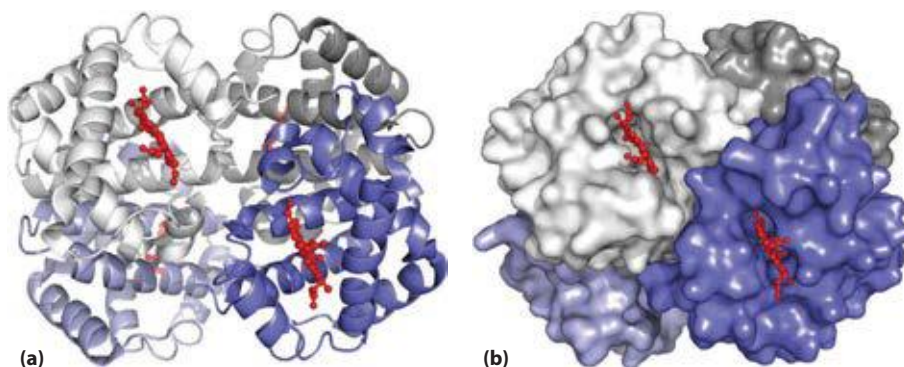



**FIGURA 4-23 Estrutura quaternária da desóxi-hemoglobina.** (PDB ID 2HHB) A análise por difração de raios X da desóxi-hemoglobina (hemoglobina sem as moléculas de oxigênio ligadas aos grupos heme) mostra como as quatro subunidades polipeptídicas estão agrupadas. **(a)** Representação na forma de fitas revela os elementos estruturais secundários da estrutura e a posição de todos os cofatores hemes. **(b)** Modelo de contorno de superfície mostra a cavidade em que os cofatores hemes estão ligados e ajuda a visualizar o empacotamento das subunidades. As subunidades $\alpha$ são mostradas em tons de cinza, e as subunidades $\beta$, em tons de azul. Observe que os grupos heme (em vermelho) estão relativamente distantes entre si.

intrinsecamente desordenada p27 exerce um papel-chave no controle da divisão celular em mamíferos. Essa proteína carece de estrutura definida quando em solução. Ela se enrola em torno e assim inibe a atividade de várias enzimas chamadas proteínas-cinases (ver Capítulo 6) que facilitam a divisão. A estrutura flexível da p27 a permite se acomodar às suas proteínas-alvo distintas. Células tumorais humanas, que são simplesmente células que perderam a capacidade de controlar a divisão celular normalmente, geralmente possuem níveis reduzidos de p27; quanto menor o nível de p27, pior é o prognóstico para o paciente de câncer. Da mesma forma, as proteínas intrinsecamente desordenadas estão frequentemente presentes como concentradores ou suportes no centro de redes proteicas que constituem as vias de sinalização. Essas proteínas ou partes delas podem interagir com muitos parceiros diferentes. Elas frequentemente assumem uma estrutura quando interagem com outras proteínas, mas as estruturas que elas assumem podem variar de acordo com o parceiro de ligação. A proteína de mamíferos p53 também é fundamental no controle da divisão celular. Ela tem segmentos estruturados e não estruturados, e os segmentos distintos interagem com dúzias de outras proteínas. Uma região não estruturada da p53 na extremidade carboxil interage com pelo menos quatro parceiros diferentes e assume uma estrutura distinta em cada complexo (**Figura 4-24**).

## RESUMO 4.3 Estruturas terciária e quaternária das proteínas

- A estrutura terciária é a estrutura tridimensional da cadeia polipeptídica. Muitas proteínas se encaixam em uma ou duas classes de proteínas em geral, com base na estrutura terciária: fibrosa e globular.
- As proteínas fibrosas, utilizadas principalmente para funções estruturais, são formadas por elementos de estrutura secundária que se repetem.
- As proteínas globulares têm estruturas terciárias mais complicadas, geralmente contendo diversos tipos de estruturas secundárias na mesma cadeia polipeptídica. A primeira estrutura de proteína globular a ser determinada, por métodos de difração de raios X, foi a estrutura da mioglobina.
- As estruturas complexas das proteínas globulares podem ser analisadas pela observação dos padrões de enovelamento chamados de motivos (também chamados de enovelamentos ou estruturas supersecundárias). Os milhares de estruturas proteicas conhecidos geralmente são formados por um repertório de apenas poucas centenas de motivos. Os domínios são regiões de uma cadeia polipeptídica que podem se dobrar de forma estável e independente.
- A estrutura quaternária resulta de interações entre as subunidades de proteínas com múltiplas subunidades

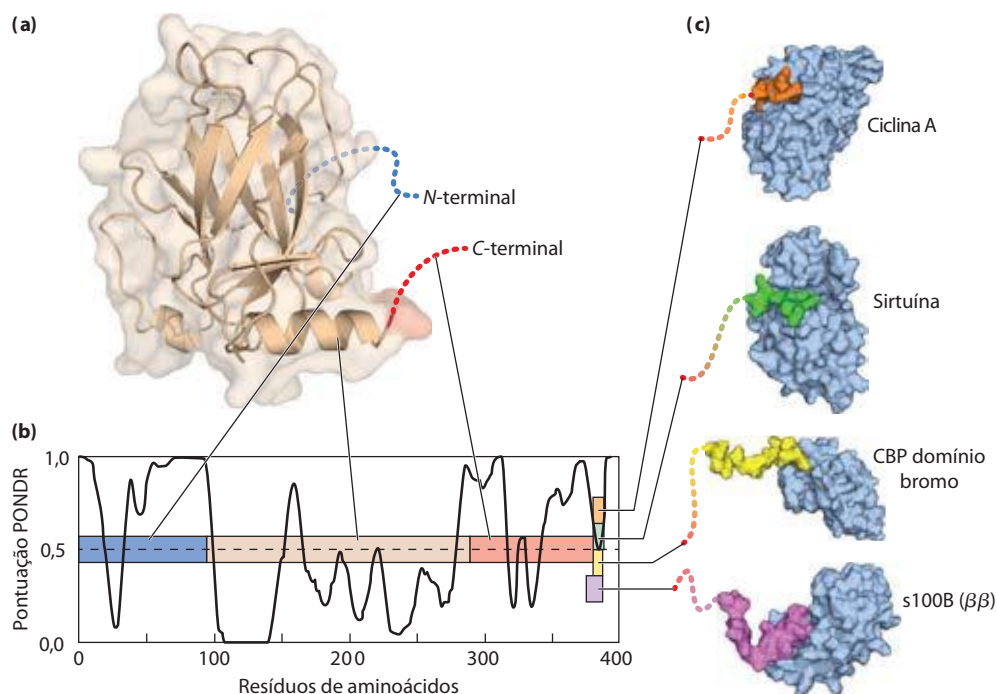



**FIGURA 4-24 Ligação da região carboxiterminal intrinsecamente desordenada da proteína p53 aos seus ligantes. (a)** A proteína p53 é composta por vários segmentos diferentes (PDB ID 1XQH). Apenas o domínio central é bem organizado. **(b)** A sequência linear da proteína p53 *está* representada na barra colorida. O gráfico sobreposto apresenta um diagrama da pontuação PONDR (Predictor of Natural Disordered Regions; Previsor de Regiões Naturalmente Desordenadas) *versus* a sequência da proteína. PONDR é um dos melhores algoritmos disponíveis para predizer a probabilidade que um determinado resíduo de aminoácido está em uma região de desordem intrínseca, com base na sequência de aminoácidos ao redor e na composição de aminoácidos. Uma pontuação de 1,0 indica uma probabilidade de 100% que a proteína estará desordenada. Nesta estrutura proteica, o domínio central em bege está organizado. As regiões aminoterminal (azul) e carboxiterminal (vermelho) estão desordenadas. A extremidade da região carboxiterminal tem múltiplos ligadores e ela se dobra quando se liga a cada um deles; no entanto, a estrutura tridimensional assumida quando ocorre a ligação é diferente para cada uma das interações mostradas, e por isso o segmento carboxiterminal (resíduos de 11 a 20) está mostrado em cor diferente em cada complexo (ciclina A, PDB ID 1H26; sirtuína, PDB ID 1MA3; CBP domínio bromo, PDB ID 1JSP; s100B ($\beta\beta$), PDB ID 1DT7).

(multiméricas) ou grandes associações de proteínas. Algumas proteínas multiméricas possuem unidades repetidas, formadas por uma única subunidade ou grupos de subunidades, cada unidade chamada protômero.

- Algumas proteínas ou segmentos proteicos são intrinsecamente desordenados, carecendo de estruturas definidas. Essas proteínas têm composições distintas de aminoácidos que permitem uma estrutura mais flexível. Algumas dessas proteínas desordenadas funcionam como componentes estruturais ou sequestradoras; outras podem interagir com muitas proteínas parceiras, servindo como inibidores versáteis ou como componentes centrais de redes de interação de proteínas.

## 4.4 Desnaturação e enovelamento das proteínas

As proteínas têm uma existência surpreendentemente precária. Como foi visto, a conformação de uma proteína nativa é apenas marginalmente estável. Além disso, a maioria das proteínas deve manter certa flexibilidade conformacional para funcionar. A manutenção contínua do grupo ativo de proteínas celulares, necessárias em um dado conjunto de condições, é chamada **proteostase**. A proteostase celular requer a atividade coordenada de vias para síntese e enovelamento de proteínas, o redobramento de proteínas parcialmente desdobradas e o sequestro e degradação de proteínas irreversivelmente desdobradas. Em todas as células, essas redes envolvem centenas de enzimas e proteínas especializadas.

Como visto na **Figura 4-25**, a vida de uma proteína engloba muito mais do que sua síntese e degradação. A estabilidade marginal da maioria das proteínas pode produzir um balanço tênue entre os estados dobrados e desdobrados. À medida que as proteínas são sintetizadas nos ribossomos (Capítulo 27), elas devem dobrar-se em sua conformação nativa. Algumas vezes isso ocorre espontaneamente, porém mais frequentemente isso ocorre com a assistência de enzimas e complexos especializados chamados chaperonas. Muitos desses mesmos auxiliares do enovelamento atuam para redobrar proteínas que se tornaram transitoriamente desdobradas. As proteínas inapropriadamente dobradas frequentemente expõem superfícies hidrofóbicas que as tornam "pegajosas", conduzindo à formação de agregados inativos. Esses agregados podem perder suas funções normais, mas não são inertes; seu acúmulo nas células situa-se no centro de doenças que vão de diabetes a doenças de Parkinson e Alzheimer. Não surpreendentemente, todas as células elaboraram vias de reciclagem e/ou degradação de proteínas irreversivelmente deformadas.

Agora serão abordadas as transições entre os estados dobrados e desdobrados, e a rede de vias que controlam essas transições.

### A perda de estrutura da proteína resulta na perda de função

As estruturas proteicas evoluíram para atuar em determinados ambientes celulares. Condições diferentes daquelas da célula podem resultar em mudanças estruturais grandes ou pequenas na proteína. A perda de estrutura tridimensional suficiente para causar a perda de função é chamada de

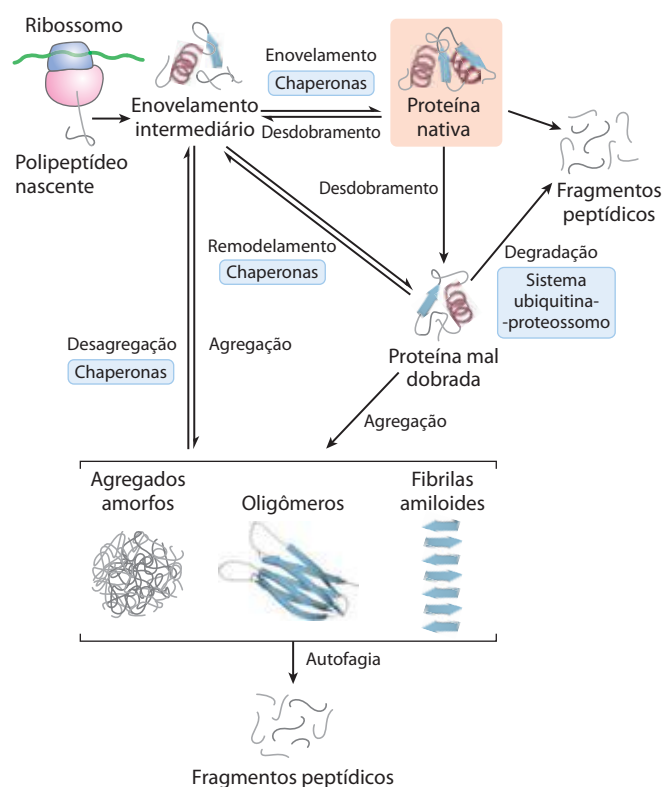



**FIGURA 4-25 Vias que contribuem para proteostase.** Três tipos de processos contribuem para proteostase. Primeiro, as proteínas são sintetizadas no ribossomo. Segundo, múltiplas vias contribuem para o enovelamento proteico, muitas dessas envolvem a atividade de complexos chamados chaperonas. As chaperonas (incluindo as chaperoninas) também contribuem para o redobramento de proteínas parcialmente ou transitoriamente desdobradas. Finalmente, proteínas irreversivelmente desdobradas estão sujeitas ao sequestro e à degradação por várias vias adicionais. As proteínas desdobradas e os intermediários proteicos enovelados que escapam do controle de qualidade das chaperonas e das vias de degradação podem agregar, formando tanto agregados desordenados quanto agregados organizados do tipo amiloide que contribuem para doenças e processos de envelhecimento.

**desnaturação**. O estado desnaturado não necessariamente corresponde ao desdobramento completo da proteína e à randomização da conformação. Na maioria das condições, as proteínas desnaturadas existem como um conjunto de estados parcialmente dobrados.

A maioria das proteínas pode ser desnaturada pelo calor, que tem efeitos complexos nas muitas interações fracas da proteína (principalmente sobre as ligações de hidrogênio). Se a temperatura é aumentada lentamente, a conformação da proteína em geral permanece intacta até que, em uma estreita faixa de temperatura, ocorre uma perda abrupta da estrutura (e da função) (**Figura 4-26**). A mudança repentina sugere que o desdobramento é um processo cooperativo: a perda de estrutura em uma parte da proteína desestabiliza as outras partes. Os efeitos do aquecimento sobre as proteínas não são facilmente preditos. As proteínas altamente termorresistentes de bactérias termofílicas e de arquibactérias evoluíram para funcionar na temperatura das fontes termais (~100°C). Mesmo assim, as estruturas dessas proteínas diferem pouco de suas proteínas homólogas de bactérias como a *Escherichia coli*. Não se sabe ao

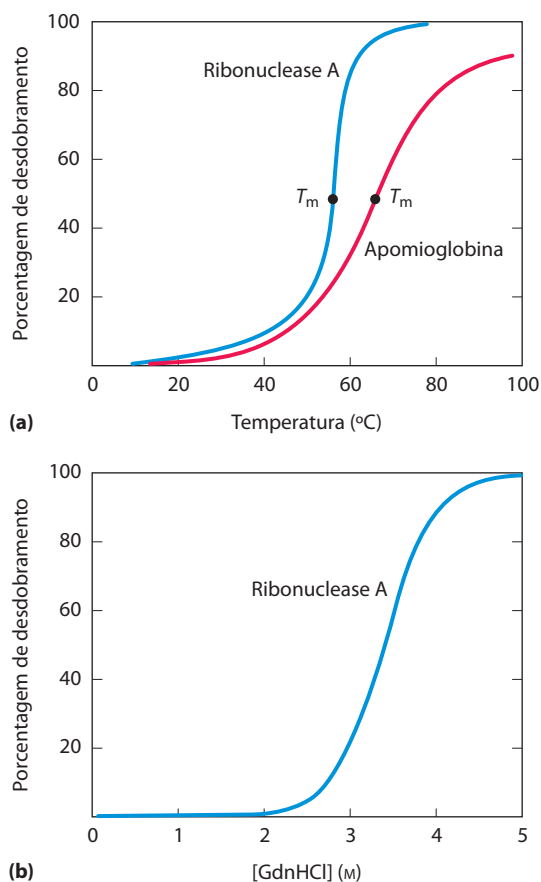



**FIGURA 4-26 Desnaturação de proteínas.** Os resultados correspondem a proteínas desnaturadas por duas modificações diferentes em seus ambientes. Em cada caso, a transição entre o estado dobrado e o estado não dobrado é abrupta, sugerindo cooperatividade neste processo. **(a)** Desnaturação térmica da apomioglobina (mioglobina sem o grupo prostético heme) de cavalo e da ribonuclease A (com suas ligações dissulfeto intactas; ver Figura 4-27). O ponto médio da faixa de temperatura em que ocorre a desnaturação é chamado de temperatura de fusão, ou $T_m$. A desnaturação da apomioglobina foi monitorada por dicroísmo circular (ver Figura 4-10), que mede a quantidade de estrutura helicoidal na proteína. A desnaturação da ribonuclease A foi acompanhada pelo monitoramento das mudanças na fluorescência intrínseca da proteína, que é afetada pelas mudanças no ambiente dos resíduos de Trp. **(b)** Desnaturação da ribonuclease A, com suas ligações dissulfeto intactas, pelo hidrocloreto de guanidina (GdnHCl), monitorado por dicroísmo circular.

certo como essas pequenas diferenças garantem a estabilidade estrutural em altas temperaturas.

As proteínas também podem ser desnaturadas por pHs extremos, por certos solventes orgânicos miscíveis, como álcool ou acetona, por certos solutos como ureia e hidrocloreto de guanidina, ou por detergentes. Cada um desses agentes desnaturantes representa um tratamento relativamente brando, já que nenhuma ligação covalente da cadeia polipeptídica é rompida. Solventes orgânicos, ureia e detergentes atuam, principalmente, rompendo as interações hidrofóbicas que mantêm o núcleo estável das proteínas globulares; a ureia também rompe as ligações de hidrogênio; extremos de pH alteram a carga líquida da proteína, causando repulsão eletrostática e o rompimento de algumas ligações de hidrogênio. As estruturas desnaturadas resultantes desses vários tratamentos não são, necessariamente, as mesmas.

A desnaturação frequentemente leva à precipitação de proteínas, uma consequência da formação de agregados proteicos pela exposição de superfícies hidrofóbicas associadas. Os agregados são, com frequência, altamente desordenados. O precipitado proteico visto após ferver um ovo é um exemplo. Agregados mais ordenados também são observados em algumas proteínas, como será visto.

## A sequência de aminoácidos determina a estrutura terciária

A estrutura terciária de uma proteína globular é determinada por sua sequência de aminoácidos. A prova mais importante disso vem dos experimentos que mostram que a desnaturação de algumas proteínas é reversível. Certas proteínas globulares desnaturadas por temperatura, extremos de pH ou agentes desnaturantes reassumem suas estruturas nativas e suas atividades biológicas se retornarem às condições nas quais a conformação nativa é estável. Esse processo é chamado de **renaturação**.

Um exemplo clássico é a desnaturação e a renaturação da ribonuclease A, demonstradas por Christian Anfinsen nos anos 1950. A ribonuclease A purificada desnatura completamente em uma solução concentrada de ureia, na presença de um agente redutor. O agente redutor rompe as quatro ligações dissulfeto, resultando em oito resíduos Cys, e a ureia rompe as interações hidrofóbicas de estabilização, desta forma liberando todo o polipeptídeo de sua conformação dobrada. A desnaturação da ribonuclease é acompanhada por uma completa perda de atividade catalítica. Quando a ureia e o agente redutor são removidos, a ribonuclease desnaturada, aleatoriamente enrolada, se dobra de modo espontâneo em sua estrutura terciária correta, com restauração total de sua atividade catalítica (**Figura 4-27**). O reenovelamento da ribonuclease é tão preciso que as quatro ligações dissulfeto intramoleculares são restabelecidas na molécula renaturada nas mesmas posições da ribonuclease nativa. Mais tarde, resultados semelhantes foram obtidos utilizando a ribonuclease A cataliticamente ativa quimicamente sintetizada. Isso elimina a possibilidade de que algum contaminante minoritário da preparação da ribonuclease purificada por Anfinsen tenha contribuído para a renaturação da enzima, afastando assim qualquer dúvida que poderia restar de que essa enzima se dobra espontaneamente.

O experimento de Anfinsen forneceu a primeira evidência de que a sequência de aminoácidos de uma cadeia polipeptídica contém todas as informações necessárias para o enovelamento da cadeia em sua estrutura tridimensional nativa. Trabalhos posteriores demonstraram que somente uma minoria de proteínas, muitas delas pequenas e estáveis por natureza, se dobrará espontaneamente em sua forma nativa. Apesar de todas as proteínas terem o potencial de se dobrar em sua estrutura nativa, muitas delas necessitam de alguma assistência.

## Os polipeptídeos dobram-se rapidamente por um processo gradual

Nas células vivas, as proteínas são construídas, a partir dos aminoácidos, em uma velocidade muito alta. Por exemplo, as células de *E. coli* podem fazer uma molécula de proteína

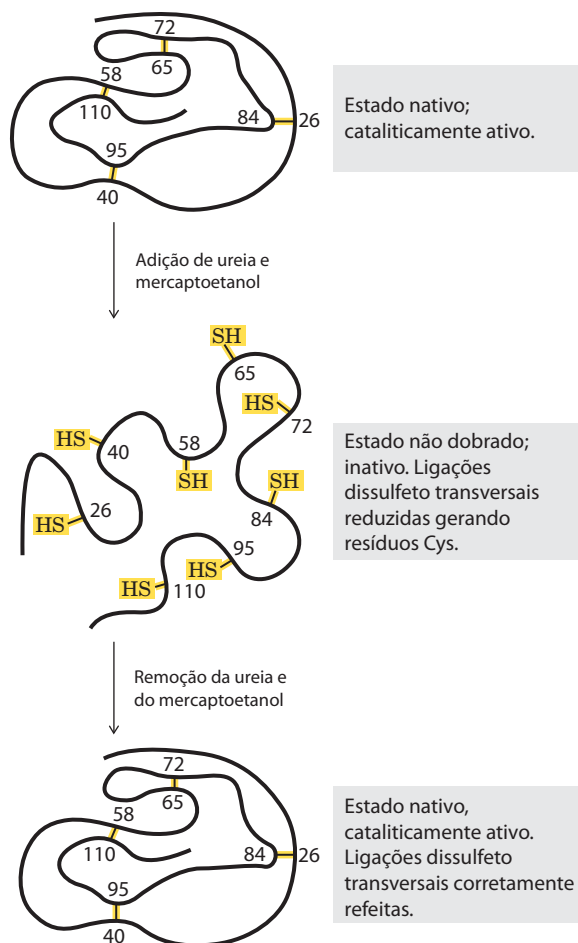



**FIGURA 4-27 Renaturação da ribonuclease desnaturada e desdobrada.** A ureia desnatura a ribonuclease, e o mercaptoetanol ($HOCH_2CH_2SH$) a reduz, rompendo as ligações dissulfeto e liberando os oito resíduos de Cys. A renaturação envolve o restabelecimento correto das ligações dissulfeto transversais.

completa, biologicamente ativa, com 100 resíduos de aminoácidos, em 5 segundos a 37°C. No entanto, a síntese das ligações peptídicas no ribossomo não é suficiente; a proteína deve dobrar-se.

Como a cadeia polipeptídica chega à sua conformação nativa? Suponha-se, de forma conservadora, que cada um dos resíduos de aminoácidos pode assumir, em média, 10 conformações diferentes, resultando em $10^{100}$ conformações diferentes do polipeptídeo. Suponha-se, também, que a proteína se dobra espontaneamente por um processo aleatório no qual ela testa todas as conformações possíveis em torno de cada uma das ligações de seu esqueleto até encontrar sua forma nativa, biologicamente ativa. Se cada conformação fosse testada no menor tempo possível (~$10^{-13}$ segundos, ou o tempo necessário para uma única vibração molecular), levaria aproximadamente $10^{77}$ anos para testar todas as possíveis conformações. Claramente, o enovelamento de proteínas não é um processo completamente aleatório, de tentativa e erro. Deve haver atalhos. Esse problema foi apontado pela primeira vez por Cyrus Levinthal, em 1968, sendo algumas vezes chamado de paradoxo de Levinthal.

A rota de enovelamento de uma cadeia polipeptídica grande é muito complicada. No entanto, rápido progresso tem sido feito nesse campo, o suficiente para produzir algoritmos robustos que podem frequentemente predizer a estrutura de proteínas menores, com base em suas sequências de aminoácidos. As principais vias de enovelamento são hierárquicas. As estruturas secundárias locais se formam primeiro. Certas sequências de aminoácidos se dobram prontamente em hélices $\alpha$ ou folhas $\beta$, guiadas por restrições como aquelas revisadas na discussão sobre estruturas secundárias. Interações iônicas, envolvendo grupos carregados que normalmente estão próximos na sequência linear da cadeia polipeptídica, podem ter um papel importante no direcionamento dos primeiros passos de enovelamento. O arranjo de estruturas locais é seguido por interações de longo alcance entre, por exemplo, elementos da estrutura secundária que se aproximam para formar estruturas enoveladas estáveis. As interações hidrofóbicas exercem um papel significativo ao longo do processo, já que a agregação das cadeias laterais de aminoácidos apolares fornece uma estabilização entrópica a intermediários e, por fim, à estrutura enovelada final. O processo continua até a formação de domínios completos e até que todo o polipeptídeo esteja dobrado (**Figura 4-28**). Proteínas nas quais predominam as interações de curto alcance (entre pares de resíduos geralmente localizados próximos um do outro na sequência polipeptídica) tendem a se dobrar mais rapidamente do que

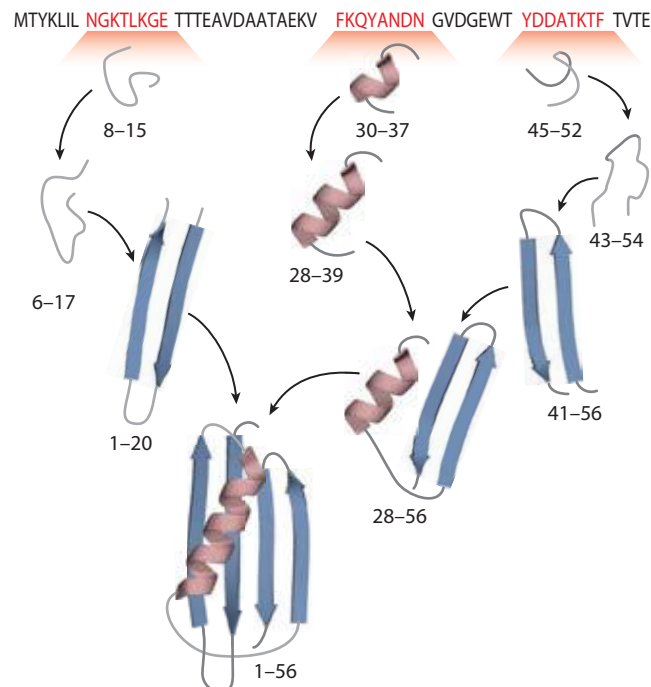



**FIGURA 4-28 Uma via de enovelamento proteico definida para uma proteína pequena.** Uma via hierárquica é mostrada com base em modelagem computacional. Primeiro, pequenas regiões de estrutura secundária são agrupadas e, então, gradualmente incorporadas em estruturas maiores. O programa usado para este modelo tem tido muito êxito na predição da estrutura tridimensional de pequenas proteínas a partir de sua sequência de aminoácidos. Os números indicam os resíduos de aminoácidos desse peptídeo de 56 resíduos que adquiriu sua estrutura final em cada uma das etapas mostradas.

proteínas com padrões de enovelamento mais complexos e com mais interações de longo alcance entre os diferentes segmentos. À medida que as proteínas com múltiplos domínios são sintetizadas, domínios próximos à extremidade aminoterminal (sintetizadas primeiro) podem se dobrar antes do polipeptídeo inteiro ter sido montado.

Termodinamicamente, o processo de enovelamento pode ser visto como um tipo de funil de energia livre (**Figura 4-29**). Os estados não dobrados são caracterizados por um alto grau de entropia conformacional e energia livre relativamente alta. À medida que o enovelamento ocorre, o estreitamento do funil reflete a diminuição do espaço conformacional que deve ser procurado, à medida que a proteína se aproxima de seu estado nativo. As pequenas depressões ao longo das paredes do funil de energia livre representam intermediários semiestáveis, que podem tornar o processo de enovelamento um pouco mais lento. No fundo do funil, o conjunto de intermediários dobrados é reduzido a uma única conformação nativa (ou a um pequeno conjunto de conformações nativas). Os funis podem ter uma variedade de formas dependendo da complexidade da via de enovelamento, da existência de intermediários semiestáveis, e do potencial de intermediários em particular se reunirem em agregados de proteínas erroneamente dobradas (Figura 4-29).

A estabilidade termodinâmica não é igualmente distribuída na estrutura da proteína – a molécula tem regiões de relativamente alta estabilidade e outras de estabilidade baixa ou desprezível. Por exemplo, uma proteína pode ter dois domínios estáveis ligados por um segmento inteiramente desordenado. Regiões de menor estabilidade podem permitir à proteína alterar sua conformação entre dois ou mais estados. Como será visto nos próximos dois capítulos, variações na estabilidade em regiões de uma proteína são, com frequência, essenciais para sua função. Proteínas ou segmentos proteicos intrinsecamente desordenados não se dobram de forma alguma.

À medida que o entendimento sobre estrutura e enovelamento de proteínas evolui, programas computacionais sofisticados para a predição da estrutura das proteínas a partir da sequência de aminoácidos têm sido desenvolvidos. A predição da estrutura tridimensional das proteínas é uma das especialidades da bioinformática, e os progressos nessa área são monitorados com um teste bianual chamado de competição CASP (Critical Assessment of Structural Prediction, ou Avaliação Crítica da Predição Estrutural). Grupos de diversas partes do mundo tentam predizer a estrutura de certa proteína (cuja estrutura já foi determinada, mas ainda não foi publicada). Os grupos que têm mais sucesso são convidados a apresentar seus resultados na conferência da CASP. O sucesso desses esforços está melhorando rapidamente.

## Algumas proteínas se dobram de forma assistida

Nem todas as proteínas se dobram espontaneamente à medida que são sintetizadas dentro da célula. O enovelamento de muitas proteínas necessita de **chaperonas**, proteínas que interagem com polipeptídeos parcialmente dobrados ou dobrados de forma incorreta, facilitando os mecanismos de enovelamento correto ou garantindo um microambiente adequado para ocorrer o enovelamento. Vários tipos de chaperonas moleculares foram encontrados em organismos que vão desde bactérias até humanos. As duas principais famílias de chaperonas, ambas bem estudadas, são a família da **Hsp70** e as **chaperoninas**.

A família de proteínas Hsp70 geralmente tem massa molecular próxima de 70.000 e são abundantes em células submetidas a altas temperaturas (por isso, a denomina-

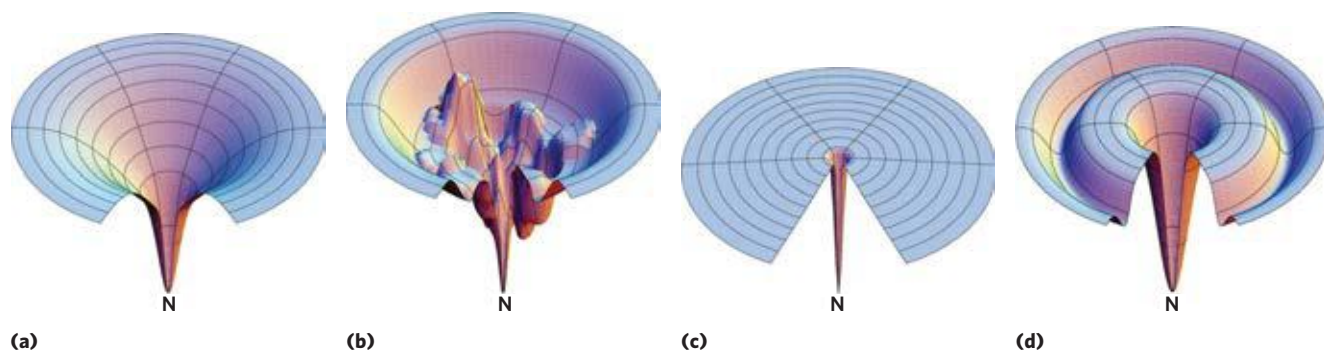



**FIGURA 4-29 Termodinâmica do enovelamento proteico, mostrado como funil de energia livre.** À medida que as proteínas se dobram, o espaço conformacional que pode ser explorado pela estrutura fica restrito. Este é modelado como funil termodinâmico tridimensional, com $\Delta G$ representado como profundidade e com a estrutura nativa (N) no fundo (ponto de menor energia-livre). O funil para determinada proteína pode ter uma variedade de formas, dependendo do número e dos tipos de intermediários de enovelamento nas vias de enovelamento. Qualquer intermediário de enovelamento com estabilidade significativa e um tempo de vida finita estaria representado como um mínimo de energia-livre local – uma depressão na superfície do funil. **(a)** Um funil simples, mas relativamente amplo e suave representa uma proteína com múltiplas vias de enovelamento (ou seja, a ordem em que as partes distintas da proteína se dobram seria de alguma forma aleatória), mas que assume suas estruturas tridimensionais sem intermediários de enovelamento com estabilidade significativa. **(b)** Este funil representa uma proteína mais comum com múltiplos intermediários de enovelamento possíveis com estabilidade significativa nas várias vias que levam à estrutura nativa. **(c)** Uma proteína com estrutura nativa estável, essencialmente sem intermediários de enovelamento com estabilidade significativa, e apenas uma ou muito poucas vias de enovelamento produtivo está mostrada como um funil com uma depressão estreita levando à forma nativa. **(d)** Uma proteína com intermediários de enovelamento com estabilidade substancial em praticamente qualquer via que leva ao estado nativo (ou seja, uma proteína na qual um motivo ou domínio particular sempre se dobra rapidamente, mas as outras partes da proteína se dobram mais lentamente e em ordem aleatória) está representada por um funil com uma depressão principal ao redor da depressão que leva à forma nativa.

ção "proteínas de choque térmico", do inglês *heat shock proteins*, de $M_r$ 70.000, ou Hsp70). As proteínas Hsp70 se ligam a regiões não dobradas do peptídeo rico em resíduos hidrofóbicos. Dessa forma, essas chaperonas "protegem" da desnaturação pela temperatura tanto as moléculas de proteína quanto as novas moléculas de peptídeo que estão sendo sintetizadas (e ainda não estão dobradas). As proteínas Hsp70 também bloqueiam o enovelamento de certas proteínas que devem permanecer não dobradas até que sejam deslocadas através da membrana (como descrito no Capítulo 27). Algumas chaperonas também facilitam o arranjo quaternário de proteínas oligoméricas. As proteínas Hsp70 se ligam aos polipeptídeos e os liberam em um ciclo que utiliza a energia da hidrólise do ATP e envolve diversas outras proteínas (incluindo uma classe chamada de Hsp40). A **Figura 4-30** ilustra um enovelamento assistido por chaperona, como o elucidado para as chaperonas Hsp70 e Hsp40 eucarióticas. A ligação de um

**FIGURA 4-30 As chaperonas no enovelamento proteico.** A rota pela qual as chaperonas da classe Hsp70 se ligam aos polipeptídeos e os liberam é ilustrada pelas chaperonas eucarióticas Hsp70 e Hsp40. As chaperonas não promovem diretamente o enovelamento da proteína, mas evitam a formação de agregados de peptídeos não dobrados. As proteínas não dobradas ou parcialmente dobradas primeiro se ligam à forma aberta da Hsp70 ligada ao ATP (PDB ID 2QXL). A Hsp40 então interage com esse complexo e induz a hidrólise do ATP produzindo a forma fechada do complexo (derivado de PDB ID 2KHO e 1DKZ), na qual os domínios coloridos em cor de laranja e amarelo estão juntos como as duas partes de uma mandíbula, mantendo presas partes da proteína desdobrada. A dissociação do ADP e a reciclagem de Hsp70 requer a interação com outra proteína, um fator de troca de nucleotídeo (NEF). Em uma população de moléculas de polipeptídeos, alguma fração das moléculas liberadas após a ligação transitória das proteínas parcialmente dobradas pela Hsp70 assumirá a conformação nativa. As remanescentes são novamente ligadas pela Hsp 70 ou desviadas para o sistema das chaperoninas (Hsp60; ver Figura 4-31). Em bactérias, as chaperonas Hsp70 e Hsp40 são chamadas DnaK e DnaJ, respectivamente. DnaK e DnaJ foram primeiro identificadas como proteínas necessárias para a replicação *in vitro* de certas moléculas de DNA viral (por isso a designação "Dna").

peptídeo não dobrado à chaperona Hsp70 pode quebrar um agregado proteico ou prevenir a formação de um novo agregado. Quando o peptídeo ligado é liberado, ele tem a chance de retomar o enovelamento à sua estrutura nativa. Se o enovelamento não ocorrer rápido o suficiente, o polipeptídeo pode ser ligado de novo e o processo se repete. Alternativamente, o polipeptídeo ligado a Hsp70 pode ser entregue a uma chaperonina.

Chaperoninas são complexos elaborados de proteínas necessários para o enovelamento de algumas proteínas celulares que não se dobram espontaneamente. Em *E. coli*, estima-se que de 10 a 15% das proteínas celulares necessitam do sistema de chaperoninas residentes, chamado de GroEL/GroES, para o enovelamento nas condições normais (mais de 30% precisam de assistência quando as células são submetidas ao estresse por calor). Em eucariotos, o sistema de chaperoninas análogo chama-se Hsp60. As chaperoninas se tornaram conhecidas quando foram consideradas necessárias para o crescimento de certos vírus bacterianos (por isso, a designação "Gro", de *growth*). Essa família de proteínas é estruturada como uma série de anéis de múltiplas subunidades, formando duas câmaras orientadas uma de costas para a outra. Uma proteína desdobrada primeiro se liga a uma superfície hidrofóbica exposta próxima a extremidade apical de uma câmara GroEL. A proteína é então presa dentro da câmara, fechada transitoriamente, pela "tampa" GroES (**Figura 4-31**). A GroEL sofre mudanças conformacionais substanciais, associadas à hidrólise lenta de ATP que também regula a ligação e a liberação de GroES. Dentro da câmara, uma proteína tem cerca de 10 segundos para se dobrar – o tempo necessário para a hidrólise do ATP ligado. A restrição de uma proteína dentro da câmara previne a agregação proteica inapropriada e também restringe o espaço conformacional que a cadeia polipeptídica pode explorar à medida que ela se enovela. A proteína é liberada quando GroES se dissocia, mas pode religar rapidamente para outro ciclo se o enovelamento não tiver sido completo. As duas câmaras em um complexo GroEL se alternam na ligação e liberação dos substratos polipeptídicos. Em eucariotos, o sistema Hsp60 utiliza um sistema semelhante para o enovelamento de proteínas. No entanto, em vez da tampa GroES, protrusões dos domínios apicais das subunidades se flexionam e fecham a câmara. O ciclo hidrolítico do ATP também é mais lento nos complexos Hsp60, dando mais tempo à proteína retida na câmara para o enovelamento.

Finalmente, as rotas de enovelamento de algumas proteínas requerem duas enzimas que catalisam reações de isomerização. A **proteína dissulfeto-isomerase** (**PDI**) é uma enzima amplamente distribuída que catalisa a interconversão, ou modificação, de ligações dissulfeto até que as ligações da conformação nativa sejam formadas. Entre suas funções, a PDI catalisa a eliminação de intermediários dobrados com ligações dissulfeto transversais inadequadas. A **peptídeo-prolil-*cis-trans*-isomerase** (**PPI**) catalisa a interconversão de isômeros *cis* e *trans* de ligações peptídicas de resíduos de Pro (Figura 4-8), que pode representar um passo lento no enovelamento de proteínas que contêm algumas ligações peptídicas com Pro na conformação *cis*.

**FIGURA 4-31 As chaperoninas no enovelamento de proteínas. (a)** Mecanismo de ação proposto para as chaperoninas GroEL (membro da família de proteínas Hsp60) e GroES de *E. coli*. Cada complexo GroEL consiste em dois anéis heptaméricos que formam duas câmaras grandes (cada subunidade com $M_r$ 57.000). A GroES, também um heptâmero (subunidades de $M_r$ 10.000), bloqueia a entrada de uma das câmaras na GroEL depois da ligação, dentro da câmara, de uma proteína desdobrada. A câmara com a proteína desdobrada é designada como *cis*; o oposto é designado *trans*. O enovelamento ocorre no interior da câmara *cis*, durante o tempo que leva para hidrolisar os 7 ATP ligados às subunidades no anel heptamérico. As moléculas de GroES e de ADP então se dissociam, e a proteína é liberada. As duas câmaras do sistema GroEL/Hsp60 alternam a ligação e facilitam o enovelamento das proteínas clientes. **(b)** Imagens da superfície e corte longitudinal do complexo GroEL/GroES (PDB ID 1AON). O corte (abaixo) ilustra o grande espaço interno no qual as outras proteínas se ligam.

## Defeitos no enovelamento proteico fornecem a base molecular para uma ampla gama de doenças genéticas em humanos

Apesar da participação de muitos processos que assistem o enovelamento proteico, erros podem ocorrer. De fato, o enovelamento proteico errado é um problema substancial para a célula, e um quarto ou mais de todos os polipeptídeos sintetizados é destruído por não se dobrar corretamente. Em alguns casos, os erros de enovelamento causam ou contribuem para o desenvolvimento de doenças graves.

Muitas condições, incluindo diabetes do tipo 2, doença de Alzheimer, doença de Huntington e doença de Parkinson, estão associadas com um mecanismo de enovelamento errôneo: uma proteína solúvel normalmente secretada pela célula é secretada em um estado de enovelamento errado, sendo convertida em uma fibra **amiloide** extracelular insolúvel. As doenças são coletivamente chamadas de **amiloidoses**. As fibras são altamente ordenadas e não ramificadas, com um diâmetro de 7 a 10 nm e alto conteúdo de estruturas do tipo folha $\beta$. Os segmentos $\beta$ são orientados de forma perpendicular ao eixo da fibra. Em algumas fibras amiloides, a estrutura geral apresenta duas camadas de folhas $\beta$ longas, como aquela mostrada para o peptídeo $\beta$-amiloide, na **Figura 4-32**.

Muitas proteínas podem assumir a estrutura da fibrila amiloide como alternativa para sua conformação dobrada normal, e a maioria dessas proteínas tem grande concentração de resíduos de aminoácidos aromáticos em uma região central das folhas $\beta$ ou hélice $\alpha$. As proteínas são secretadas em uma conformação não totalmente dobrada. O núcleo (ou parte dele) se dobra em uma folha $\beta$ antes que o resto da proteína se dobre corretamente, e as folhas $\beta$ de duas ou mais moléculas de proteínas com enovelamento incompleto se associam para começar a formação de uma fibrila amiloide. A fibrila cresce no espaço extracelular. Outras partes da proteína, então, se dobram de forma diferente, ficando externas ao núcleo de folhas $\beta$ da fibrila em formação. O efeito dos aminoácidos aromáticos na estabilização da estrutura é mostrado na Figura 4-32c. A maioria das moléculas proteicas se dobra corretamente; por isso, o surgimento dos sintomas das amiloidoses geralmente é muito lento. Se uma pessoa herda uma mutação, como a substituição de um resíduo aromático em uma posição que favorece a formação de fibrilas amiloides, os sintomas da doença podem começar mais cedo.

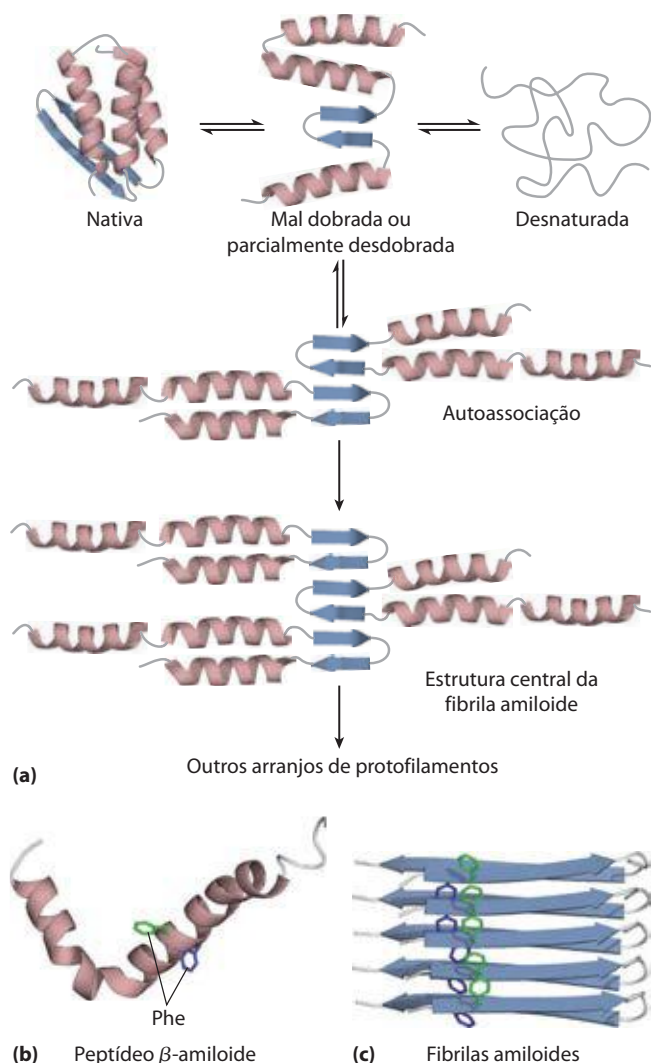



**FIGURA 4-32 Formação das fibrilas amiloides causadoras de doenças.** **(a)** Moléculas de proteínas cuja estrutura normal inclui regiões de folhas $\beta$ passam por enovelamento parcial. Em um pequeno número de moléculas, antes do enovelamento completo, as regiões de folhas $\beta$ de um polipeptídeo se associam com a mesma região de outro polipeptídeo, formando o núcleo de um amiloide. Outras moléculas de proteína lentamente se associam ao amiloide e o estendem para formar uma fibrila. **(b)** O peptídeo $\beta$-amiloide inicia como dois segmentos $\alpha$-helicoidais de uma proteína maior. A clivagem proteolítica desta proteína maior libera o peptídeo $\beta$-amiloide relativamente instável, que perde sua estrutura $\alpha$-helicoidal. Ele pode, então, lentamente ser organizado em fibrilas amiloides **(c)**, que contribuem para as placas características no exterior do tecido nervoso das pessoas com doença de Alzheimer. As cadeias laterais aromáticas mostradas aqui exercem um papel significativo na estabilização da estrutura amiloide. A estrutura amiloide é rica em folhas $\beta$, com as fitas $\beta$ arranjadas perpendicularmente ao eixo da fibrila amiloide. O peptídeo $\beta$-amiloide assume a forma de duas camadas de folhas $\beta$ paralelas estendidas. Alguns peptídeos formadores de amiloide podem se dobrar na forma de hélices $\beta$ voltadas para esquerda (ver Figura 4-22).

Em eucariotos, as proteínas destinadas à secreção iniciam seu enovelamento no retículo endoplasmático (RE; conferir via no Capítulo 27). Quando ocorrem condições de estresse ou quando a síntese proteica ameaça sobrecarregar a capacidade de enovelamento proteico do RE, pode ocorrer o acúmulo de proteínas desdobradas. Essas condições disparam a resposta a proteínas não dobradas (UPR, de *unfolded protein response*). Um conjunto de reguladores transcricionais que constituem a UPR alinha os vários sistemas por aumentar a concentração de chaperonas no RE ou por diminuir a taxa global de síntese proteica, ou ambos. Os agregados amiloides que se formam antes da UPR podem ser removidos. Alguns são degradados por **autofagia**. Nesse processo, eles são primeiro encapsulados em uma membrana, e, então, o conteúdo da vesícula resultante é degradado após a fusão com um lisossomo citosólico. Alternativamente, as proteínas erroneamente dobradas podem ser degradadas por um sistema de proteases chamado sistema ubiquitina-proteossomo (descrito no Capítulo 27). Defeitos em qualquer um desses sistemas diminuem a capacidade de lidar com proteínas erroneamente dobradas e aumentam a propensão para o desenvolvimento de doenças amiloides.

Algumas amiloidoses são sistêmicas, envolvendo vários tecidos. A mais simples é causada pela deposição de fibrilas formadas por cadeias leves de imunoglobulinas com enovelamento incorreto (ver Capítulo 5), ou fragmentos de cadeias leves derivados da degradação proteolítica. A idade média de aparecimento é de 65 anos. Os pacientes têm sintomas como fadiga, rouquidão, inchaço e perda de peso, e muitos morrem dentro de um ano após o diagnóstico. Os rins e o coração geralmente são os órgãos mais afetados. Algumas amiloidoses estão associadas com outros tipos de doenças. Indivíduos com certas infecções crônicas ou doenças inflamatórias como artrite reumatoide, tuberculose, fibrose cística e alguns cânceres podem ter um grande aumento de secreção de um polipeptídeo pró-amiloide chamado de proteína amiloide sérica A (SAA, do inglês *serum amyloid A*). Essa proteína, ou fragmentos dessa proteína, se deposita no tecido conectivo do baço, dos rins, do fígado e ao redor do coração. Indivíduos com essa condição, conhecida como amiloidose sistêmica secundária, apresentam inúmeros sintomas, dependendo dos órgãos inicialmente afetados. A doença geralmente é fatal dentro de poucos anos. Mais de 80 amiloidoses estão associadas com mutações na transtirretina (proteína que se liga aos hormônios da tireoide e os transporta, distribuindo-os pelo corpo e cérebro). Uma grande variedade de mutações nessa proteína leva à deposição amiloide, concentrada ao redor de diferentes tecidos, produzindo assim diferentes sintomas. As amiloidoses também estão associadas com mutações hereditárias nas proteínas lisozima, cadeia $\alpha$ do fibrinogênio A e apolipoproteínas A-I e A-II, todas descritas nos capítulos posteriores.

Algumas doenças amiloides estão associadas com órgãos específicos. A proteína pró-amiloide geralmente é secretada somente pelos tecidos afetados, e sua alta concentração local leva à deposição de amiloide ao redor do tecido (embora algumas proteínas possam estar sistematicamente distribuídas). Um lugar comum de deposição de amiloide é próximo às células das ilhotas $\beta$ pancreáticas, responsáveis pela secreção de insulina e regulação do metabolismo de glicose (ver Figura 23-26). A secreção pelas células $\beta$ de um pequeno peptídeo (37 aminoácidos), chamado de polipeptídeo amiloide das ilhotas (PPAI, ou IAPP, do inglês *islet amyloid polypeptide*), pode levar à deposição de amiloide ao redor das ilhotas, destruindo gradualmente as células. Um adulto saudável tem de 1 a 1,5 milhão de células $\beta$ pancreáticas. Com a perda progressiva dessas células, a home-

## QUADRO 4-6  MEDICINA Morte por enovelamento errado: as doenças priônicas

Uma proteína cerebral dobrada de forma errada parece ser o agente causador de doenças cerebrais neurodegenerativas raras em mamíferos. Talvez a mais conhecida seja a encefalopatia espongiforme bovina (EEB, ou BSE, do inglês *bovine spongiform encephalopathy*; também conhecida como doença da vaca louca). Doenças relacionadas incluem a kuru e a doença de Creutzfeldt-Jakob em humanos, *scrapie* em ovinos, e doença debilitante crônica em cervos e alces. Essas doenças também são conhecidas como encefalopatias espongiformes porque o cérebro doente frequentemente se torna cheio de buracos (Figura Q-1). A deterioração progressiva do cérebro leva a um espectro de sintomas neurológicos, incluindo perda de peso, comportamento errático, problemas de postura, equilíbrio e coordenação, e perda da capacidade cognitiva. Essas doenças são fatais.

Nos anos de 1960, pesquisadores descobriram que amostras de agentes causadores de doença pareciam não conter ácidos nucleicos. Naquela época, Tikvah Alper sugeriu que o agente fosse uma proteína. Inicialmente, a ideia pareceu uma heresia. Todos os agentes causadores de doenças conhecidos até aquele momento – vírus, bactérias, fungos, e assim por diante – continham ácidos nucleicos, e sua virulência estava relacionada à reprodução genética e propagação. Entretanto, quatro décadas de investigações, realizadas mais notavelmente por Stanley Prusiner, forneceram evidências de que as encefalopatias espongiformes são diferentes.

Os agentes infecciosos foram identificados como uma única proteína ($M_r$ 28.000), que Prusiner apelidou de proteína **príon** (PrP). O nome foi derivado de *proteinaceous infectious* (proteína infecciosa), mas Prusiner

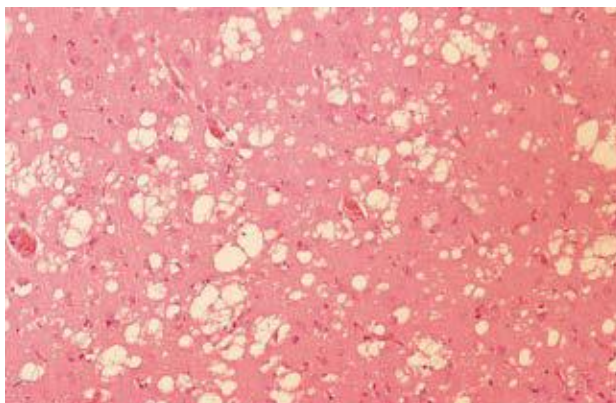



**FIGURA Q-1** Secção corada de córtex cerebral, da necropsia de um paciente com a doença de Creutzfeldt-Jakob, mostra a degeneração espongiforme (vacuolar), a característica neuro-histológica mais comum. Os vacúolos amarelados são intracelulares e ocorrem, majoritariamente, em processos pré e pós-sinápticos de neurônios. Os vacúolos nesta secção variam de 20 a 100 $\mu$m em diâmetro.

achou que “príon” soava melhor do que “proin”. A proteína príon é um constituinte normal do tecido cerebral em todos os mamíferos. Seu papel não é conhecido em detalhes, mas deve ter uma função de sinalização molecular. Linhagens de camundongos sem o gene para PrP (e, por isso, sem a proteína) sofrem efeitos maléficos não óbvios. A doença ocorre somente quando a PrP celular normal, ou $PrP^C$, apresenta uma conformação alterada chamada de $PrP^{Sc}$ (Sc significa *scrapie*). A estrutura de $PrP^C$ caracteriza-se por duas hélices $\alpha$. A estrutura de

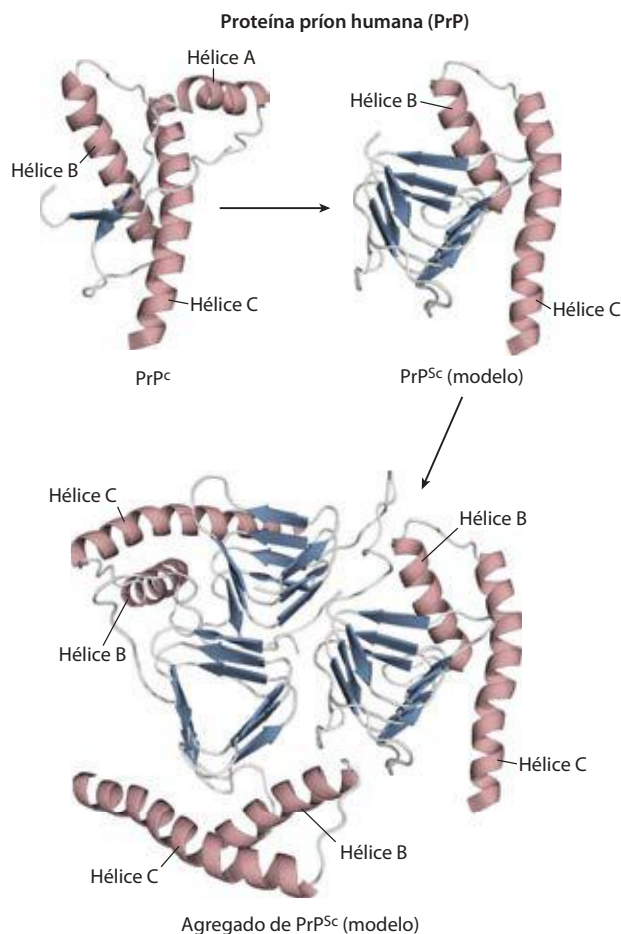
ostase de glicose é afetada e, no final, quando 50% ou mais células são perdidas, a condição evolui para diabetes melito do tipo 2 (independente de insulina).

As doenças de deposição amiloide que induzem neurodegeneração, especialmente em adultos idosos, são uma classe especial de amiloidoses localizadas. A doença de Alzheimer está associada com deposição amiloide extracelular pelos neurônios, envolvendo o peptídeo amiloide $\beta$ (Figura 4-32b), derivado de uma grande proteína transmembrana (proteína precursora de amiloide $\beta$) encontrada na maioria dos tecidos humanos. Quando ele faz parte de uma proteína maior, o peptídeo é composto por dois segmentos $\alpha$-helicoidais que atravessam a membrana. Quando os domínios externos e internos são clivados por proteases específicas, o peptídeo $\beta$-amiloide relativamente instável deixa a membrana e perde sua estrutura $\alpha$-helicoidal. Ele pode então tomar a forma de duas camadas de folhas $\beta$ paralelas estendidas, que lentamente podem se reunir em fibrilas amiloides (Figura 4-32c). O depósito dessas fibras amiloides parece ser a causa primária da doença de Alzheimer, mas um segundo tipo de agregado do tipo amiloide, envolvendo a proteína chamada tau, também ocorre intracelularmente (nos neurônios) em pessoas com doença de Alzheimer. Mutações hereditárias na proteína tau não resultam em Alzheimer, mas causam demência frontotemporal e parkinsonismo (condição com sintomas que lembram a doença de Parkinson), que pode ser igualmente devastadora.

Várias outras condições neurodegenerativas envolvem agregação intracelular de proteínas com enovelamento errado. Na doença de Parkinson, a forma mal dobrada da proteína $\alpha$-sinucleína se agrega em massas esféricas filamentosas, chamadas de corpos de Lewy. A doença de Huntington envolve a proteína huntingtina, que tem uma longa repetição de poliglutaminas. Em alguns indivíduos, essa repetição é maior do que o normal, ocorrendo um tipo de agregação intracelular mais sutil. Notavelmente, quando proteínas mutantes humanas envolvidas nas doenças de Parkinson e Huntington são expressas em *Drosophila melanogaster*, as moscas demonstram degeneração expressa como deterioração dos olhos, tremores e morte precoce. Todos esses sintomas são altamente suprimidos se a expressão da chaperona Hsp70 também estiver aumentada.

$PrP^{Sc}$ é muito diferente, com a maior parte da estrutura convertida em folhas $\beta$ semelhante à amiloide (Figura Q-2). A interação da $PrP^{Sc}$ com a $PrP^{C}$ converte a última em $PrP^{Sc}$, iniciando um efeito dominó no qual cada vez mais proteínas do cérebro se convertem na forma causadora da doença. O mecanismo pelo qual a presença de $PrP^{Sc}$ resulta em encefalopatia espongiforme não é conhecido.

A forma hereditária das doenças priônicas, uma mutação no gene que codifica a PrP, produz uma mudança em um resíduo de aminoácido que acredita-se tornar a conversão de $PrP^{C}$ em $PrP^{Sc}$ mais favorável. Um completo entendimento das doenças priônicas aguarda novas informações de como uma proteína príon afeta as funções cerebrais. Informações estruturais sobre PrP estão começando a fornecer indicativos quanto ao processo molecular que permite às proteínas priônicas interagirem de forma a alterar sua conformação (Figura Q-2).

**FIGURA Q-2** Estrutura do domínio globular de uma PrP humana (PDB ID 1QLX) e dos modelos de $PrP^{Sc}$ mal dobrada, na conformação causadora de doença e de um agregado $PrP^{Sc}$. As hélices $\alpha$ estão marcadas para ajudar a ilustrar a mudança conformacional. A hélice A é incorporada na estrutura da folha $\beta$ da conformação mal dobrada.

O mal enovelamento proteico não necessariamente significa que a formação de amiloide cause doenças sérias. Por exemplo, a fibrose cística é causada por defeitos em uma proteína de membrana chamada de reguladora transmembrana da fibrose cística (CFTR, do inglês *cystic fibrosis transmembrane conductance*), que atua como canal de íons cloreto. A mutação mais comum que causa a fibrose cística é uma deleção de um resíduo Phe na posição 508 da CFTR, que causa o enovelamento inapropriado da proteína. A maior parte dessa proteína é então degradada, e sua função normal é perdida (ver Quadro 11-2). Muitas das doenças relacionadas com mutações no colágeno (p. 130) também causam um enovelamento defeituoso. Um tipo particular e famoso de enovelamento errado de proteína pode ser visto nas doenças priônicas (Quadro 4-6). ■

## RESUMO 4.4 Desnaturação e enovelamento das proteínas

- A manutenção do estado estável da coleção de proteínas celulares ativas necessárias em um conjunto de condições específicas – chamada proteoestase – envolve um conjunto elaborado de vias e processos que dobram, redobram e degradam cadeias polipeptídicas.
- A estrutura tridimensional e a função da maioria das proteínas podem ser destruídas pela desnaturação, demonstrando uma relação entre estrutura e função. Algumas proteínas desnaturadas podem renaturar espontaneamente para formar proteínas biologicamente ativas, mostrando que as estruturas terciárias são determinadas pela sequência de aminoácidos.
- O enovelamento de proteínas nas células é geralmente hierárquico. Inicialmente, regiões de estrutura secundária podem se formar, o que é seguido pelo enovelamento em motivos e domínios. Grandes conjuntos de intermediários dobrados são rapidamente conduzidos a uma única conformação nativa.
- Para muitas proteínas, o enovelamento é facilitado por chaperonas Hsp70 e por chaperoninas. A formação de ligações dissulfeto e a isomerização *cis-trans* de ligações peptídicas contendo Pro são catalisadas por enzimas específicas.
- O enovelamento errado é a base molecular de uma grande variedade de doenças humanas, incluindo as amiloidoses.

## Termos-chave

*Os termos em negrito estão definidos no glossário.*



## Leituras adicionais

### Geral

**Anfinsen, C.B.** (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-230.
O autor revisa seu trabalho clássico sobre ribonuclease.

**Creighton, T.E.** (1993) *Proteins: Structure and Molecular Properties*, 2nd edn, W. H. Freeman and Company, New York.
Fonte abrangente e confiável.

**Kendrew, J.C.** (1961) The three-dimensional structure of a protein molecule. *Sci. Am.* **205** (December), 96-111.
Descreve como a estrutura da mioglobina foi determinada e o que foi descoberto a partir dela.

**Richardson, J.S.** (1981) The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Protein. Chem.* **34**, 167-339.
Excelente resumo sobre padrões e princípios estruturais de proteínas. O autor iniciou a representação em "fitas", amplamente utilizada para estruturas de proteínas.

### Estruturas secundária, terciária e quaternária

**Beeby, M., O'Connor, B.D., Ryttersgaard, C., Boutz, D.R., Perry, L.J. & Yeates, T.O.** (2005) The genomics of disulfide bonding and protein stabilization in thermophiles. *PLoS Biol.* **3**, e 309.

**Brown, J.H.** (2006) Breaking symmetry in protein dimmers: designs and function. *Protein Sci* **15**, 1-13.

**Dunker, A.K. & Kriwacki, R.W.** (2011) The orderly chaos of proteins. *Sci. Am.* **304** (April), 68–73.
Um bom resumo do trabalho sobre proteínas que perderam sua estrutura intrínseca.

**Herráez, A.** (2006) Biomolecules in the computer. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **34**, 255–261.

**McPherson, A.** (1989) Macromolecular crystals. *Sci. Am.* **260** (march), 62-69.
Uma descrição de como macromoléculas como as proteínas são cristalizadas.

**Milner-White, E.J.** (1997) The partial charge of the nitrogen atom in peptide bonds. *Protein Sci.* **6**, 2477–2482.

**Ponting, C.P. & Russel, R.R.** (2002) The natural history of protein domains. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, 45-71.
Uma explicação de como bancos de dados estruturais podem ser utilizados para explorar a evolução.

### Desnaturação e enovelamento de proteínas

**Chiti, F & Dobson, C.M.** (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 333-366.

**Dill, K.A., Ozkan, S.B., Shell, M.S., & Weikl, T.R.** (2008) The protein folding problem. *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 289–316.

**Grazit, E.** (2005) Mechanisms of amyloid fibril self-assembly and inhibition. FEBS J. **272**, 5971-5978.

**Hartl, F.U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M.** (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **475**, 324–332.

**Hoppener, J.W.M. & Lips, C.J.M.** (2006) Role of islet amyloid in type 2 diabetes melito. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 726-736.

**Kapinga, H.H. & Craig, E.A.** (2010) The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 11, 579–592.

**Norrby, E.** (2011) Prions and protein-folding diseases. *J. Intern. Med.* **270**, 1–14.

**Prusiner, S.B.** (1995) The prion disease. *Sci. Am.* **272** (January), 48-57.
Um bom resumo da evidência que levou à hipótese do príon.

**Selkoe, D.J.** (2003) Folding proteins in fatal ways. *Nature* **426**, 900-904.
Um bom resumo sobre amiloidoses.

**Tang, Y., Chang, H., Roeben, A., Wischnewski, D., Wischnewski, N., Kerner, M., Hartl, F., & Hayer-Hartl, M.** (2006) Structural features of the GroEL-GroES nanocage required form rapid folding of encapsulated protein. *Cell* **125**, 903-914.

**Tyedmers, J., Mogk, A., & Bukau, B.** (2010) Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Rev.Mol. Cell Biol.* **11**, 777–788.

## Problemas

**1. Propriedades da ligação peptídica.** Nos estudos de raios X de peptídeos cristalizados, Linus Pauling e Robert Corey constataram que a ligação C—N da ligação peptídica tem um comprimento intermediário (1,32 Å) entre uma ligação simples C—N (1,49 Å) e uma ligação dupla C═N (1,27 Å). Também observaram que a ligação peptídica é planar (todos os quatro átomos ligados ao grupo C—N estão no mesmo plano), e que os dois átomos de carbono ligados ao C—N são sempre *trans* um em relação ao outro (em lados opostos da ligação peptídica).

(a) O que o comprimento da ligação C—N da ligação peptídica indica sobre sua força e sua ordem de ligação (isto é, se ela é simples, dupla ou tripla)?

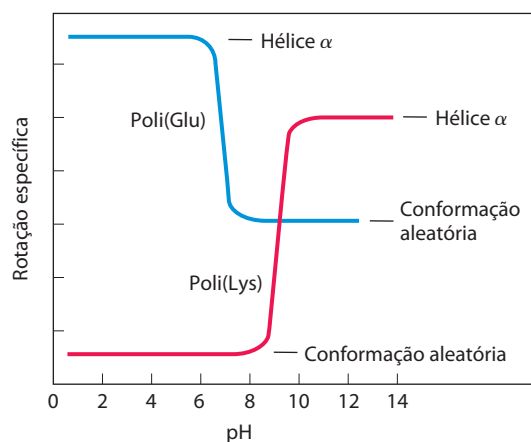
(b) O que as observações de Pauling e Corey nos dizem a respeito da facilidade de rotação sobre o eixo C—N da ligação peptídica?

**2. Relações estruturais e funcionais em proteínas fibrosas.** William Astbury descobriu que o padrão de difração de raios X da lã mostra uma unidade estrutural repetida espaçada de 5,2 Å ao longo do comprimento da fibra de lã. Quando ele fervia e esticava a lã, o padrão de raios X mostrava uma nova unidade estrutural que se repetia, com um espaçamento de 7,0 Å. Ferver e esticar a lã e depois deixar que ela se retraia novamente resulta em um padrão de raios X consistente com o espaçamento original de 5,2 Å. Apesar de as observações fornecerem pistas importantes sobre a estrutura molecular da lã, Astbury não foi capaz de interpretá-las naquela época.

(a) Levando em conta o atual conhecimento sobre a estrutura da lã, interprete as observações de Astbury.

(b) Quando blusões e meias de lã são lavados em água quente ou aquecidos em uma máquina de secar, eles encolhem. Por outro lado, a seda não encolhe em condições iguais. Explique.

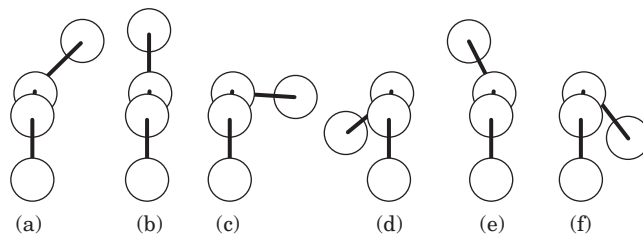
**3. Velocidade de síntese da $\alpha$-queratina do cabelo.** O cabelo cresce com a velocidade de 15 a 20 cm/ano. Todo esse crescimento está concentrado na base da fibra de cabelo, onde os filamentos de $\alpha$-queratina são sintetizados dentro das células vivas da epiderme, sendo arranjados em estruturas com formato de cordas (ver Figura 4-11). O elemento estrutural principal da $\alpha$-queratina é a hélice $\alpha$, que tem 3,6 resíduos de aminoácidos por volta e avança 5,4 Å por volta (ver Figura 4-4a). Assumindo que a biossíntese de cadeias de queratina $\alpha$-helicoidal é o fator limitante da velocidade de crescimento do cabelo, calcule a velocidade na qual as ligações peptídicas das cadeias de $\alpha$-queratina devem ser sintetizadas (ligações peptídicas por segundo) para justificar o crescimento anual observado para o cabelo.

**4. Efeito do pH na conformação das estruturas secundárias $\alpha$-helicoidais.** O desdobramento da hélice $\alpha$ de um polipeptídeo para formar uma estrutura enrolada aleatoriamente é acompanhado por um grande decréscimo em uma propriedade chamada de rotação específica, que mede a capacidade de uma solução de desviar a luz circularmente polarizada. O poliglutamato, polipeptídeo formado somente de resíduos L-Glu, tem uma conformação $\alpha$-helicoidal em pH 3. Quando o pH sobe para 7, há uma grande perda da rotação específica da solução. Da mesma forma, a polilisina (resíduos L-Lys) forma uma hélice $\alpha$ em pH 10, mas, quando o pH é diminuído para 7, a rotação específica também diminui, como mostrado no gráfico a seguir.

Qual é a explicação para o efeito da mudança de pH nas conformações da poli(Glu) e da poli(Lys)? Por que a transição ocorre em uma faixa tão estreita de pH?

**5. Ligações dissulfeto determinam as propriedades de diversas proteínas.** Algumas proteínas naturais são ricas em ligações dissulfeto, e suas propriedades mecânicas (tensão elástica, viscosidade, dureza, etc.) estão correlacionadas com o grau de ligações dissulfeto.

(a) A glutenina, proteína do trigo rica em ligações dissulfeto, é responsável pelo caráter aderente e elástico da massa feita com farinha de trigo. Similarmente, a natureza dura e resistente do casco da tartaruga é devida às inúmeras ligações dissulfeto de sua $\alpha$-queratina. Qual é a base molecular para a correlação entre o conteúdo de ligações dissulfeto e as propriedades mecânicas da proteína?

(b) A maioria das proteínas globulares é desnaturada e perde sua atividade quando aquecida brevemente a 65°C. Entretanto, as proteínas globulares que contêm múltiplas ligações dissulfeto geralmente têm que ser aquecidas por mais tempo e a temperaturas mais altas para que desnaturem. Uma dessas proteínas é o inibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI, de *bovine pancreatitic trypsin inhibitor*), que tem 58 resíduos de aminoácidos em uma única cadeia e contém três ligações dissulfeto. No resfriamento de uma solução de BPTI desnaturada, a atividade da proteína é restaurada. Qual é a base molecular para essa propriedade?

**6. Ângulos diedros.** Uma série de ângulos de torção, $\phi$ e $\psi$, que podem ser adotados pelo esqueleto peptídico está mostrada abaixo. Qual desses corresponde ao $\phi$ e $\psi$ para uma hélice tripla de colágeno ideal? Consulte a Figura 4-9 como guia.

**7. Sequência de aminoácidos e estrutura de proteínas.** O crescente entendimento de como as proteínas se dobram permite que os pesquisadores façam predições sobre a estrutura de uma proteína, com base em dados sobre sua sequência primária de aminoácidos. Considere a seguinte sequência de aminoácidos:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Ile–Ala –His –Thr–Tyr–Gly –Pro–Phe–Glu–Ala –

11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
Ala–Met–Cys–Lys–Trp–Glu –Ala–Gln –Pro –Asp–

21 22 23 24 25 26 27 28
Gly–Met–Glu–Cys–Ala–Phe–His–Arg

(a) Onde devem ocorrer dobras ou voltas $\beta$?

(b) Onde devem se formar ligações dissulfeto intramoleculares?

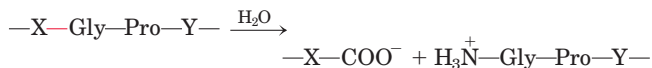
(c) Assumindo que esta sequência é parte de uma proteína globular maior, indique a localização provável (na superfície externa ou no interior da proteína) dos seguintes resíduos de aminoácido: Asp, Ile, Thr, Ala, Gln, Lys. Explique sua resposta. (Dica: observe o índice de hidropatia na Tabela 3-1.)

**8. A bacteriorrodopsina em proteínas púrpuras de membrana.** Sob condições ambientais adequadas, a arquibactéria *Halobacterium halobium* sintetiza uma proteína de membrana ($M_r$ 26.000) conhecida como bacteriorrodopsina, que é púrpura devido a seu conteúdo em retinal (ver Figura 10-21). Moléculas dessa proteína se agregam em "manchas púrpuras" na membrana celular. A bacteriorrodopsina atua como bomba de prótons ativada pela luz, que fornece energia para as funções da célula. A análise por raios X dessa proteína revela que ela consiste em sete segmentos $\alpha$-helicoidais paralelos, cada um deles atravessando a membrana celular da bactéria (espessura de 45 Å). Calcule o número mínimo de resíduos de aminoácidos necessários para um segmento de hélice $\alpha$ atravessar completamente a membrana. Estime a fração proteica da bacteriorrodopsina que está envolvida em hélices transmembrana. (Use uma massa média de 110 para os resíduos de aminoácido.)

**9. Terminologia da estrutura de proteínas.** A mioglobina é um motivo, um domínio ou uma estrutura tridimensional completa?

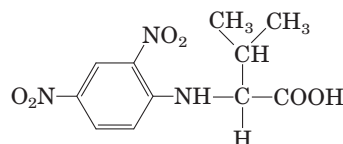
**10. Interpretando os diagramas de Ramachandran.** Examine as duas proteínas marcadas (a) e (b) abaixo. Quais dos dois diagramas de Ramachandran, marcados (c) e (d), é mais provável ser derivado de qual das proteínas? Por quê?

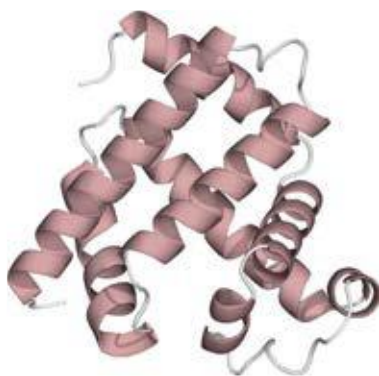
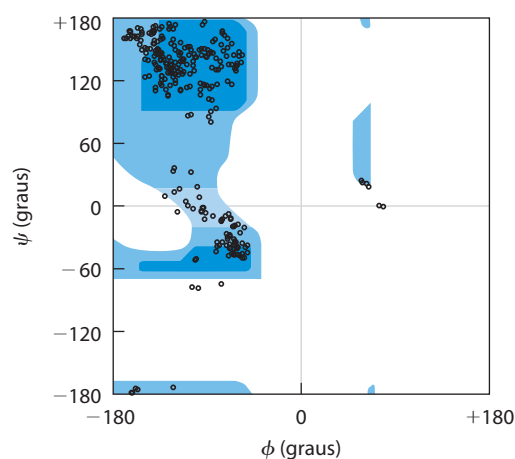
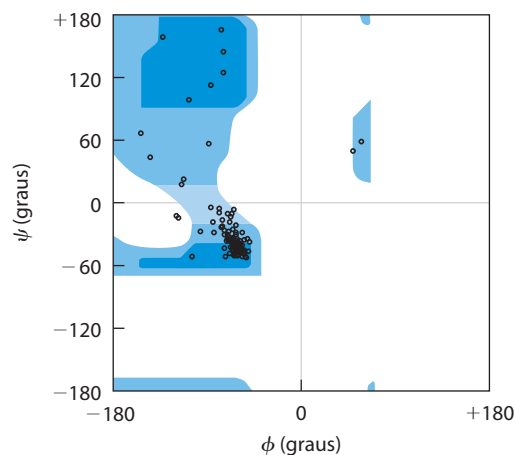
**11. Ação patogênica da bactéria que causa gangrena gasosa.** A bactéria anaeróbia altamente patogênica *Clostridium perfringens* é responsável pela gangrena gasosa, condição na qual o tecido animal tem sua estrutura destruída. Essa bactéria secreta uma enzima que catalisa de maneira eficiente a hidrólise das ligações peptídicas indicadas em vermelho:

$$\text{—X—Gly—Pro—Y—} \xrightarrow{H_2O} \text{—X—COO}^- + H_3\overset{+}{N}\text{—Gly—Pro—Y—}$$

em que X e Y são qualquer um dos 20 aminoácidos comuns. Como a secreção dessa enzima contribui para a capacidade de invasão desta bactéria nos tecidos humanos? Por que essa enzima não afeta a própria bactéria?

**12. Número de cadeias polipeptídicas em uma proteína com múltiplas subunidades.** Uma amostra (660 mg) de uma proteína oligomérica de $M_r$ 132.000 foi tratada com um excesso de 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (reagente de Sanger) sob condições levemente alcalinas até que a reação química se completasse. As ligações peptídicas da proteína foram, então, completamente hidrolisadas pelo aquecimento com HCl concentrado. O hidrolisado continha 5,5 mg do seguinte composto:

$NO_2$   $CH_3$ $CH_3$ / CH

$O_2N$—(anel benzênico)—NH—C—COOH, com H no carbono α

(a)

(b)

(c)

(d)

Derivados 2,4-dinitrofenil dos grupos $\alpha$-amino de outros aminoácidos não foram encontrados.

(a) Explique como essa informação pode ser usada para determinar o número de cadeias polipeptídicas na proteína oligomérica.

(b) Calcule o número de cadeias polipeptídicas nesta proteína.

(c) Que outra técnica de análise de proteínas você poderia utilizar para determinar se as cadeias dessa proteína são iguais ou diferentes?

**13. Predição de estrutura secundária.** Qual dos seguintes peptídeos é mais propenso a assumir uma estrutura $\alpha$-helicoidal? Por quê?

(a) LKAENDEAARAMSEA

(b) CRAGGFPWDQPGTSN

**14. Fibras amiloides em doenças.** Diversas pequenas moléculas aromáticas, como o vermelho de fenol (utilizado como modelo de fármaco não tóxico), são conhecidas por inibir a formação de amiloides em sistemas modelo em laboratório. Um objetivo da pesquisa desses pequenos compostos aromáticos é a identificação de um fármaco que iniba de modo eficiente a formação de amiloides no cérebro das pessoas com a doença de Alzheimer incipiente.

(a) Sugira por que moléculas com substituintes aromáticos evitariam a formação de amiloides.

(b) Alguns pesquisadores sugeriram que um fármaco usada para tratar a doença de Alzheimer também poderia ser efetivo no tratamento de diabetes melito do tipo 2 (independente de insulina). Por que um único fármaco poderia ser efetivo no tratamento dessas duas doenças diferentes?

## Bioquímica na internet

**15. Modelagem de proteínas na internet.** Um grupo de pacientes com a doença de Crohn (doença inflamatória do intestino) foi submetido à biópsia das mucosas intestinais para identificar o agente causador da doença. Os pesquisadores identificaram uma proteína que estava presente em níveis mais altos nos pacientes com a doença de Crohn do que em pacientes com outras doenças inflamatórias do intestino, ou no grupo controle. A proteína foi isolada, e a seguinte sequência *parcial* de aminoácidos foi obtida (leia da esquerda para a direita):

EAELCPDRCI HSFQNLGIQC VKKRDLEQAI
SQRIQTNNNP FQVPIEEQRG DYDLNAVRLC
FQVTVRDPSG RPLRLPPVLP HPIFDNRAPN
TAELKICRVN RNSGSCLGGD EIFLLCDKVQ
KEDIEVYFTG PGWEARGSFS QADVHRQVAI
VFRTPPYADP SLQAPVRVSM QLRRPSDREL
SEPMEFQYLP DTDDRHRIEE KRKRTYETFK
SIMKKSPFSG PTDPRPPPRR IAVPSRSSAS
VPKPAPQPYP

(a) Você pode identificar esta proteína utilizando um banco de dados de proteínas da Internet. Alguns bons lugares para começar sua busca incluem o Protein Information Resource (PIR; http://pir.georgetown.edu), o Structural Classification of Proteins (SCOP; http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop) e o Prosite (http://prosite.expasy.org).

No banco de dados selecionado por você, siga as indicações para a ferramenta de comparação de sequências. Coloque aproximadamente 30 resíduos da sequência da proteína no campo de busca adequado, e submeta-o para análise. O que essa análise lhe diz sobre a identidade da proteína?

(b) Tente utilizar diferentes porções da sequência de aminoácidos. Você sempre obtém o mesmo resultado?

(c) Uma grande variedade de sites da *web* fornece informações sobre a estrutura tridimensional das proteínas. Encontre informações sobre estruturas secundárias, terciárias e quaternárias da proteína utilizando bancos de dados como o Protein Data Bank (PDB; www.pdb.org) ou o SCOP.

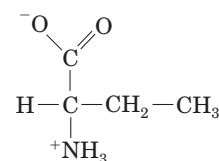
(d) Durante sua busca na internet, o que você aprendeu sobre a função celular da proteína?

## Problema de análise de dados

**16. Proteínas imagem-especulares.** Como apresentado no Capítulo 3, "os resíduos de aminoácidos em uma molécula de proteína são exclusivamente estereoisômeros L". Não está claro se essa seletividade é necessária para o funcionamento correto da proteína ou se é um acidente da evolução. Para explorar essa questão, Milton e colaboradores (1992) publicaram um estudo de uma enzima inteiramente formada de estereoisômeros D. A enzima que eles escolheram foi a HIV-protease, enzima proteolítica sintetizada pelo HIV, que converte as pré-proteínas virais inativas em suas formas ativas.

Anteriormente, Wlodawer e colaboradores (1989) relataram a síntese completa da protease do HIV a partir de aminoácidos L (a enzima L), usando o processo mostrado na Figura 3-32. As proteases do HIV normais contêm dois resíduos Cys nas posições 67 e 95. Como a síntese química de proteínas contendo Cys é tecnicamente difícil, Wlodawer e colaboradores substituíram os dois resíduos Cys da proteína pelo aminoácido sintético ácido L-$\alpha$-amino-$n$-butírico (Aba). Segundo os autores, isso foi feito para "reduzir as dificuldades sintéticas associadas com a desproteção da Cys e para facilitar o manuseio do produto".

(a) A estrutura do Aba é mostrada abaixo. Por que essa é uma substituição adequada para um resíduo Cys? Sob quais circunstâncias ela não seria adequada?

$^{-}O \quad O$
C
H—C—$CH_2$—$CH_3$
$^{+}NH_3$

Ácido L-$\alpha$-amino-$n$-butírico

Wlodawer e colaboradores desnaturaram a proteína recém-sintetizada por dissolução em 6 M de hidrocloreto de guanidina, e então permitiram que ela se dobrasse lentamente, retirando a guanidina por diálise contra um tampão neutro (glicerol 10%, 25 mM $NaPO_4$, pH 7).

(b) Existem várias razões para prever que uma proteína sintetizada, desnaturada e dobrada dessa maneira não seja ativa. Dê três razões para isso.

(c) De maneira interessante, a L-protease resultante foi ativa. O que essa descoberta lhe informa sobre o papel das ligações dissulfeto na molécula de protease do HIV nativa?

Em seus estudos, Milton e colaboradores sintetizaram a protease do HIV a partir de D-aminoácidos, utilizando o mesmo protocolo do estudo anterior (Wlodawer et al.). Formalmente, existem três possibilidades para o enovelamento da D-protease: resultaria em uma molécula com (1) o mesmo formato da

L-protease; (2) a imagem especular da L-protease; ou (3) alguma outra coisa, possivelmente inativa.

(d) Para cada uma das possibilidades, decida se elas são prováveis ou não e defenda a sua posição.

Na verdade, a D-protease foi ativa: ela hidrolisou um substrato sintético específico e foi inibida por inibidores específicos. Para examinar a estrutura das D e L-enzimas, Milton e colaboradores testaram a atividade das duas formas com as formas D e L de substratos peptídicos quirais, e a capacidade de inibição pelas formas D- e L de peptídeos quirais análogos ao substrato. As duas formas também foram testadas quanto à inibição pelo inibidor aquiral azul de Evans. Os resultados aparecem na tabela.

| | Hidrólise do substrato | | Inibição | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Peptídeo inibidor | | Azul de Evans |
| HIV--protease | D-substrato | L-substrato | D-inibidor | L-inibidor | (aquiral) |
| L-protease | − | + | − | + | + |
| D-protease | + | − | + | − | + |

(e) Qual dos três modelos propostos é sustentado pelos dados? Explique sua resposta.

(f) Por que o azul de Evans inibe as duas formas de protease?

(g) Você esperaria que a quimotripsina pudesse digerir a D-protease?

(h) Você esperaria, para qualquer enzima, que a síntese total a partir de D-aminoácidos, seguida de renaturação, resultasse em uma enzima ativa? Explique sua resposta.

## Referências

**Milton, R.C., Milton, S.C., & Kent, S.B.** (1992) Total chemical synthesis of a D-enzyme: the enantiomers of HIV-1 protease show demonstration of reciprocal chiral substrate specificity. *Science* **256**, 1445-1448.

**Wlodawer, A. Miller, M., Jaskólski, M., Sathyanarayana, B.K., Baldwin, E., Webwe, I.T., Selk, L.M., Clawson, L., Schneider, J., & Kent, S.B.** (1989) Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science* **245**, 616-621.

5

# Função Proteica



O conhecimento da estrutura tridimensional de uma proteína é importante para entender seu funcionamento; no entanto, a estrutura mostrada em duas dimensões em uma página é ilusoriamente estática. As proteínas são moléculas dinâmicas cujas funções dependem de modo quase invariável de interações com outras moléculas, e essas interações são afetadas de maneiras fisiologicamente importantes por mudanças sutis ou súbitas na conformação proteica. Este capítulo analisa de que forma as proteínas interagem com outras moléculas e como essas interações estão relacionadas com a estrutura dinâmica da proteína. As interações moleculares são de extrema importância para a função proteica. Como foi visto no capítulo anterior, a função das proteínas fibrosas como elementos estruturais de células e tecidos depende de interações quaternárias estáveis e de longa duração entre cadeias polipeptídicas idênticas. Como será abordado neste capítulo, as funções de muitas outras proteínas envolvem interações com uma grande variedade de moléculas diferentes. A maioria dessas interações é transitória, embora possa ser a base de processos fisiológicos complexos como o transporte do oxigênio, a função imune e a contração muscular, tópicos examinados neste capítulo. As proteínas que realizam esses processos esclarecem os princípios essenciais da função proteica citados a seguir, alguns deles já comentados no capítulo anterior:

As funções de muitas proteínas envolvem a ligação reversível com outras moléculas. Uma molécula que interage de modo reversível com uma proteína é chamada de **ligante**, que pode ser qualquer tipo de molécula, incluindo outra proteína. A natureza transitória das interações proteína-ligante é fundamental para a vida, pois permite que um organismo responda de maneira rápida e reversível a mudanças ambientais e condições metabólicas.

Um ligante interage com uma região da proteína chamada de **sítio de ligação**, que é complementar a ele em tamanho, forma, carga e caráter hidrofílico ou hidrofóbico. Além disso, a interação é específica: a proteína pode diferenciar milhares de moléculas diferentes no seu ambiente e interagir seletivamente somente com uma ou algumas. Determinada proteína pode ter sítios de ligação separados para vários ligantes diferentes. Essas interações moleculares específicas são cruciais na manutenção do alto grau de ordem em um sistema vivo. (Esta discussão exclui a ligação da água, que pode interagir fraca e inespecificamente com muitas partes de uma proteína. O Capítulo 6 estuda a água como ligante específico para muitas enzimas.)

As proteínas são flexíveis. Mudanças na conformação podem ser sutis, refletindo vibrações moleculares e pequenos movimentos de resíduos de aminoácidos por toda a proteína. Assim, diz-se que uma proteína flexível está "respirando". Mudanças na conformação também podem ser muito significativas, com segmentos importantes da estrutura proteica movendo-se por uma distância de vários nanômetros. Mudanças conformacionais específicas frequentemente são essenciais para a função proteica.

A interação de uma proteína com seu ligante está acoplada a uma mudança de conformação da proteína que torna o sítio de ligação mais complementar ao ligante, permitindo uma interação mais firme. A adaptação estrutural que ocorre entre proteína e ligante é chamada de **encaixe induzido**.

Em uma proteína com várias subunidades, mudanças conformacionais em uma delas com frequência afetam a conformação das demais.

As interações entre proteínas e ligantes podem ser reguladas, geralmente por meio de interações específicas com um ou mais ligantes adicionais, causando mudanças conformacionais na proteína que afetam a interação com o primeiro ligante.

As enzimas representam um caso especial de função proteica. Elas se ligam a outras moléculas e as transformam quimicamente – ou seja, catalisam reações. As moléculas sobre as quais as enzimas exercem seus efeitos são

chamadas de **substratos** da reação em vez de ligantes, e o sítio de ligação é chamado de **sítio catalítico** ou **sítio ativo**. Este capítulo enfatiza as funções não catalíticas das proteínas. No Capítulo 6, será estudada a catálise enzimática, tópico central em bioquímica. O leitor perceberá que os temas deste capítulo – ligação, especificidade e mudança conformacional – continuarão no próximo capítulo, com o acréscimo da participação das proteínas nas alterações químicas.

## 5.1 Interação reversível de uma proteína com um ligante: proteínas de ligação ao oxigênio

A mioglobina e a hemoglobina talvez sejam as proteínas mais estudadas e melhor compreendidas. Foram as primeiras a ter sua estrutura tridimensional elucidada e ilustram quase todos os aspectos do mais central dos processos bioquímicos: a interação reversível de um ligante com uma proteína. Esse modelo clássico de função proteica é muito útil para compreender como as proteínas funcionam. **Proteínas de ligação ao oxigênio-mioglobina: armazenamento de oxigênio**

### O oxigênio liga-se ao grupo prostético heme

O oxigênio é pouco solúvel em soluções aquosas (consultar Tabela 2-3) e não pode ser transportado para os tecidos em quantidade suficiente se estiver simplesmente dissolvido no plasma sanguíneo. A difusão do oxigênio pelos tecidos também não é eficiente em distâncias maiores do que alguns milímetros. A evolução de animais maiores e multicelulares dependeu do desenvolvimento de proteínas capazes de transportar e armazenar oxigênio. Contudo, nenhuma cadeia lateral dos aminoácidos das proteínas é adaptada para a ligação reversível de moléculas de oxigênio. Essa função é exercida por determinados metais de transição, entre eles o cobre e o ferro, que apresentam forte tendência para ligar oxigênio. Os organismos multicelulares exploram as propriedades dos metais, sobretudo do ferro, para o transporte do oxigênio. Contudo, o ferro livre promove a formação de espécies de oxigênio altamente reativas, como as hidroxilas, que podem danificar o DNA e outras macromoléculas. Por isso, o ferro usado nas células está ligado em formas que o sequestram e/ou o tornam menos reativo. Nos organismos multicelulares – especialmente aqueles nos quais o ferro, na sua capacidade de transportar oxigênio, deve ser transportado a grandes distâncias –, o ferro é incorporado em um grupo prostético chamado de **heme**, ligado à proteína. (Lembre-se do Capítulo 3 que um grupo prostético é um composto associado permanentemente a uma proteína e que contribui para sua função.)

O heme consiste em uma complexa estrutura orgânica em anel, **protoporfirina**, à qual se liga um único átomo de ferro no estado ferroso ($Fe^{2+}$) (**Figura 5-1**). Esse átomo de ferro tem seis ligações de coordenação, quatro delas com os átomos de nitrogênio que fazem parte do sistema plano do **anel de porfirina** e duas perpendiculares à porfirina. Os átomos de nitrogênio coordenados (que têm caráter de doador de elétrons) ajudam a prevenir a conversão do ferro do heme para o estado férrico ($Fe^{3+}$). No estado $Fe^{2+}$, o ferro liga oxigênio de forma reversível; no estado $Fe^{3+}$, ele não liga oxigênio. O heme é encontrado em muitas proteínas transportadoras de oxigênio, assim como em algumas proteínas que participam das reações de oxirredução (transferência de elétrons), como os citocromos (Capítulo 19).

As moléculas de heme livres (não ligadas a uma proteína) deixam o $Fe^{2+}$ com duas ligações de coordenação "abertas". A reação simultânea de uma molécula de $O_2$ com duas moléculas de heme livres (ou dois $Fe^{2+}$ livres) pode resultar em uma conversão irreversível de $Fe^{2+}$ em $Fe^{3+}$. Nas proteínas que contêm heme, essa reação é impedida pelo sequestro do heme no interior da estrutura da proteína. Assim, o acesso às duas ligações de coordenação abertas fica restrito. Uma delas está ocupada pelo nitrogê-

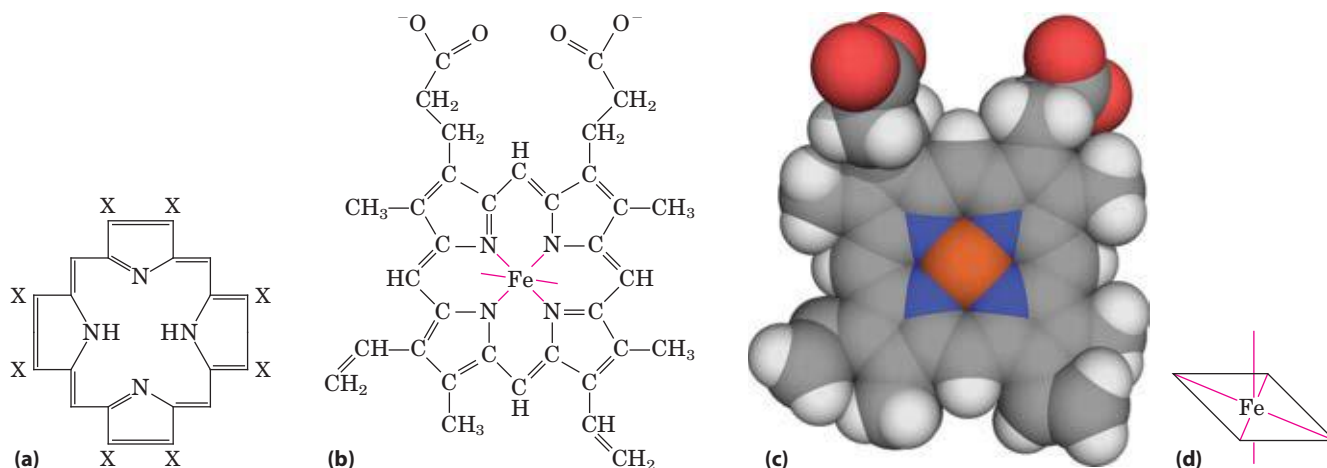



**FIGURA 5-1 Heme.** O grupo heme está presente na mioglobina, na hemoglobina e em muitas outras proteínas, designadas hemeproteínas. O heme consiste em uma estrutura orgânica complexa em anel, a protoporfirina IX, com um átomo de ferro ligado no estado ferroso ($Fe^{2+}$). **(a)** As porfirinas, das quais a protoporfirina IX é apenas um exemplo, consistem em quatro anéis pirrólicos unidos por pontes de meteno, com substituições em uma ou mais posições marcadas com X. **(b, c)** Duas representações do heme (derivadas de PDB ID 1CCR). O átomo de ferro tem seis ligações de coordenação: quatro no plano do anel e ligadas ao sistema do anel planar da porfirina, e **(d)** duas perpendiculares a ele.

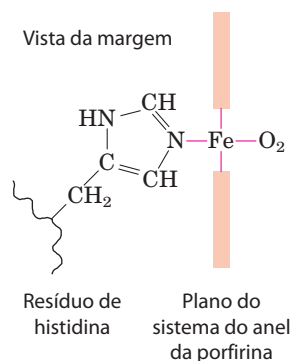



**FIGURA 5-2** **Vista lateral do grupo heme.** Esta vista mostra as duas ligações de coordenação com o $Fe^{2+}$ perpendiculares ao sistema de anel da porfirina. Uma é ocupada por um resíduo de His, também chamado de His proximal; a outra é o sítio de ligação para o oxigênio. As quatro ligações de coordenação remanescentes estão no plano do anel e ligadas ao sistema de anel planar da porfirina.

nio da cadeia lateral de um resíduo de histidina. A outra é o sítio de ligação para o oxigênio molecular ($O_2$) (**Figura 5-2**). Quando o oxigênio se liga, as propriedades eletrônicas do ferro são alteradas; isso leva à mudança de cor do sangue venoso pobre em oxigênio, roxo-escuro, para o vermelho-brilhante do sangue arterial rico em oxigênio. Algumas moléculas pequenas, como o monóxido de carbono (CO) e o óxido nítrico (NO), coordenam com o ferro do heme com maior afinidade do que o $O_2$. Quando uma molécula de CO está ligada ao heme, o $O_2$ é excluído; por isso o CO é altamente tóxico para os organismos aeróbios (tópico explorado mais adiante, no Quadro 5-1). Pelo fato de envolverem e sequestrarem o heme, as proteínas de ligação ao oxigênio regulam o acesso do CO e de outras moléculas pequenas ao ferro do heme.

## As globinas são uma família de proteínas de ligação ao oxigênio

As **globinas** formam uma ampla família de proteínas, todas com estruturas primária e terciária semelhantes. As globinas são comumente encontradas em todas as classes dos eucariotos e mesmo em algumas bactérias. A maioria atua no armazenamento ou no transporte de oxigênio, embora algumas tenham um papel de sensores de oxigênio, óxido nítrico ou monóxido de carbono. O nematódeo simples *Caenorhabditis elegans* tem genes que codificam 33 diferentes globinas. Nos humanos e em outros mamíferos, existem, pelo menos, quatro tipos de globinas. A mioglobina monomérica facilita a difusão do oxigênio no tecido muscular. A mioglobina é particularmente abundante nos músculos de mamíferos marinhos, como as focas e as baleias, pois também exerce função de armazenamento de oxigênio em mergulhos prolongados. A hemoglobina tetramérica é responsável pelo transporte do oxigênio na corrente sanguínea. A neuroglobina monomérica se expressa em neurônios e ajuda a proteger o cérebro da hipóxia (baixo nível de oxigênio) ou da isquemia (restrição do suprimento de sangue). A citoglobina, outra globina monomérica, é encontrada em altos níveis em uma gama de tecidos, mas sua função não é conhecida.

## A mioglobina tem um único sítio de ligação ao oxigênio

A mioglobina ($M_r$ 16.700; abreviada Mb) consiste em um único polipeptídeo de 153 resíduos de aminoácidos com uma molécula de heme. Como é típico de um polipeptídeo de globina, a mioglobina é formada por oito segmentos $\alpha$-helicoidais conectados por inflexões (**Figura 5-3**). Cerca de 78% dos resíduos de aminoácidos das proteínas estão nessas hélices $\alpha$.

Qualquer discussão detalhada sobre a função proteica envolverá a estrutura proteica. No caso da mioglobina, primeiro serão apresentadas certas regras estruturais características das globinas. Como pode ser visto na Figura 5-3, os segmentos helicoidais são denominados de A a H. Um resíduo de aminoácido é designado pela posição na sequência de aminoácidos ou por sua localização na sequência de um segmento $\alpha$-helicoidal específico. Por exemplo, o resíduo de His coordenado com o heme na mioglobina, $His^{93}$ (o 93º resíduo a contar da extremidade aminoterminal da sequência polipeptídica), é também chamado de His F8 (o oitavo resíduo da hélice $\alpha$ F). As inflexões na estrutura são designadas AB, CD, EF, FG, e assim por diante, refletindo os respectivos segmentos conectados.

## As interações proteína-ligante podem ser quantitativamente descritas

A função da mioglobina depende da capacidade da proteína de não somente ligar oxigênio, mas também de liberá-lo quando e onde ele for necessário. Como a função em bioquímica frequentemente gira em torno de uma interação

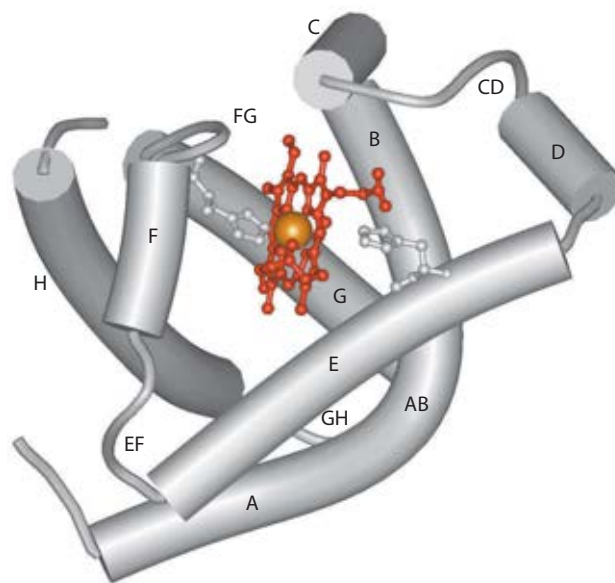



**FIGURA 5-3** **Mioglobina.** (PDB ID 1MBO) Os oito segmentos $\alpha$-helicoidais (mostrados aqui como cilindros) estão marcados de A até H. Os resíduos não helicoidais nas inflexões que os conectam estão marcados como AB, CD, EF, e assim por diante, indicando os segmentos que eles interconectam. Algumas inflexões, incluindo BC e DE, são abruptas e não contêm resíduos; elas normalmente não estão marcadas. (O segmento curto visível entre D e E é um artefato da representação computacional.) O heme está ligado em um bolsão formado na maior parte pelas hélices E e F, embora resíduos de aminoácidos de outros segmentos da proteína também participem.

proteína-ligante reversível desse tipo, uma descrição quantitativa dessa interação constitui a parte central de muitas investigações bioquímicas.

Em geral, a ligação reversível de uma proteína (P) a um ligante (L) pode ser descrita por uma **expressão de equilíbrio** simples:

$$\mathrm{P + L \rightleftharpoons PL} \qquad (5\text{-}1)$$

A reação é caracterizada por uma constante de equilíbrio, $K_a$, tal que

$$K_a = \frac{[\mathrm{PL}]}{[\mathrm{P}][\mathrm{L}]} = \frac{k_a}{k_d} \qquad (5\text{-}2)$$

onde $k_a$ e $k_d$ são constantes de velocidade (mais detalhes adiante). O termo $\boldsymbol{K_a}$ é uma **constante de associação** (não confundir com o $K_a$ que significa a constante de dissociação do ácido; p. 62) que descreve o equilíbrio entre o complexo e os seus componentes separados. A constante de associação é uma medida da afinidade do ligante L pela proteína. $K_a$ tem unidades de $\mathrm{M}^{-1}$; um valor mais alto de $K_a$ corresponde a uma afinidade mais alta do ligante pela proteína.

O termo de equilíbrio $K_a$ é equivalente também à razão entre as velocidades das reações para a frente (associação) e reversa (dissociação) que formam o complexo PL. A velocidade de associação é descrita pela constante de velocidade $k_a$, e a dissociação pela constante de velocidade $k_d$. Conforme será discutido no capítulo seguinte, as constantes de velocidade são constantes de proporcionalidade, que descrevem a fração de um conjunto de reagentes que reage em um dado espaço de tempo. Quando a reação envolve uma molécula, como na reação de dissociação $\mathrm{PL} \longrightarrow \mathrm{P + L}$, a reação é de *primeira ordem* e a constante de velocidade ($k_d$) tem unidade de tempo recíproca ($\mathrm{s}^{-1}$). Quando a reação envolve duas moléculas, como a reação de associação $\mathrm{P + L} \longrightarrow \mathrm{PL}$, ela é chamada de *segunda ordem*, e a constante de velocidade ($k_a$) tem unidades de $\mathrm{M}^{-1}\,\mathrm{s}^{-1}$.

**CONVENÇÃO-CHAVE:** As constantes de equilíbrio são escritas com $K$ maiúsculo e as constantes de velocidade com $k$ minúsculo. ■

O rearranjo da primeira parte da Equação 5-2 mostra que a razão entre a proteína ligada e a livre é diretamente proporcional à concentração do ligante livre:

$$K_a[\mathrm{L}] = \frac{[\mathrm{PL}]}{[\mathrm{P}]} \qquad (5\text{-}3)$$

Quando a concentração do ligante for muito maior do que a concentração dos sítios de interação com o ligante, a interação com a proteína não altera de modo significativo a concentração do ligante livre (não ligado) – isto é, [L] permanece constante. Essa condição é muito aplicável à maioria dos ligantes que interagem com proteínas nas células e simplifica a descrição do equilíbrio de ligação.

Agora é possível considerar o equilíbrio de ligação do ponto de vista da fração, $\theta$ (teta), dos sítios de interação com o ligante na proteína que estão ocupados pelo ligante:

$$\theta = \frac{\text{sítios de interação ocupados}}{\text{total de sítios de interação}} = \frac{[\mathrm{PL}]}{[\mathrm{PL}] + [\mathrm{P}]} \qquad (5\text{-}4)$$

Substituindo $K_a[\mathrm{L}][\mathrm{P}]$ por [PL] (ver Equação 5-3) e rearranjando os termos, obtém-se

$$\theta = \frac{K_a[\mathrm{L}][\mathrm{P}]}{K_a[\mathrm{L}][\mathrm{P}] + [\mathrm{P}]} = \frac{K_a[\mathrm{L}]}{K_a[\mathrm{L}] + 1} = \frac{[\mathrm{L}]}{[\mathrm{L}] + \frac{1}{K_a}} \qquad (5\text{-}5)$$

O valor de $K_a$ pode ser determinado a partir de uma curva de $\theta$ *versus* a concentração do ligante livre, [L] (**Figura 5-4a**). Qualquer equação do tipo $x = y/(y + z)$ descreve uma hipérbole, e conclui-se que $\theta$ é uma função hiperbólica de [L]. A fração dos sítios de interação ocupados pelo ligante se aproxima assintoticamente da saturação à medida que [L] aumenta. A [L] na qual a metade dos sítios disponíveis está ocupada (i.e., $\theta = 0{,}5$) corresponde a $1/K_a$.

No entanto, é mais comum (e intuitivamente mais simples) considerar a **constante de dissociação**, $\boldsymbol{K_d}$, que é a recíproca de $K_a$ ($K_d = 1/K_a$), sendo dada em unidades de concentração molar (M). $K_d$ é a constante de equilíbrio para a liberação do ligante. As expressões relevantes mudam para

$$K_d = \frac{[\mathrm{P}][\mathrm{L}]}{[\mathrm{PL}]} = \frac{k_d}{k_a} \qquad (5\text{-}6)$$

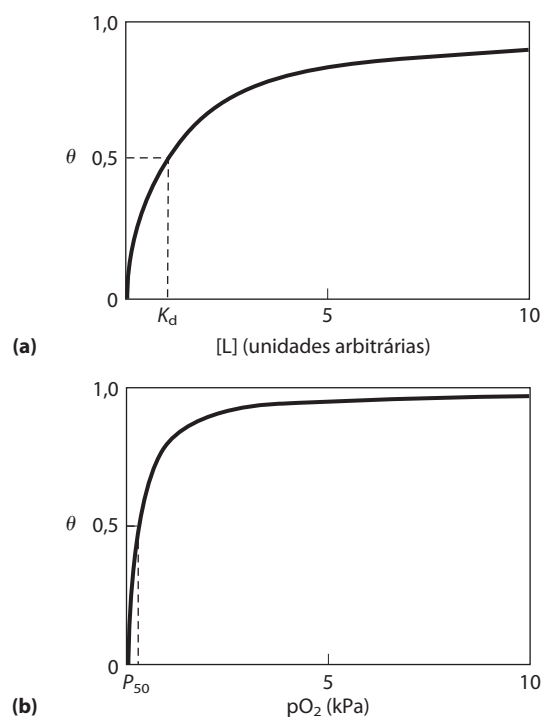
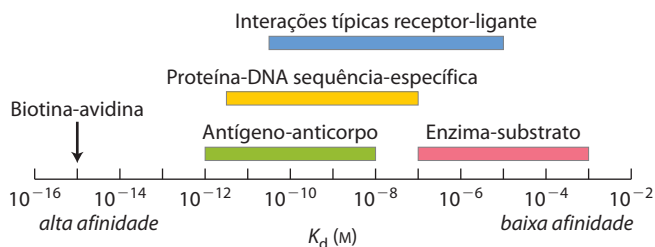



**FIGURA 5-4 Representação gráfica da interação com o ligante.** A fração ocupada dos sítios de interação com o ligante, $\theta$, é representada graficamente em relação à concentração do ligante livre. Ambas as curvas são hipérboles retangulares. **(a)** Curva de ligação hipotética para o ligante L. A [L] na qual a metade dos sítios de ligação estão ocupados é equivalente a $1/K_a$ ou $K_d$. A curva tem uma assíntota horizontal quando $\theta = 1$ e uma vertical (não mostrada) quando $[\mathrm{L}] = -1/K_a$. **(b)** Curva que descreve a ligação do oxigênio à mioglobina. A pressão parcial do $O_2$ no ar acima da solução é expressa em quilopascais (kPa). O oxigênio liga-se fortemente à mioglobina, com $P_{50}$ de apenas 0,26 kPa.

**TABELA 5-1** Algumas constantes de dissociação proteicas

| Proteína | Ligante | $K_d$ (M)* |
|---|---|---|
| Avidina (clara de ovo) | Biotina | $1 \times 10^{-15}$ |
| Receptor de insulina (humano) | Insulina | $1 \times 10^{-10}$ |
| Imunoglobulina anti-HIV (humana)† | gp41 (proteína de superfície do HIV-1) | $4 \times 10^{-10}$ |
| Proteína de ligação a níquel (*E. coli*) | $Ni^{2+}$ | $1 \times 10^{-7}$ |
| Calmodulina (rato)‡ | $Ca^{2+}$ | $3 \times 10^{-6}$ <br> $2 \times 10^{-5}$ |

As barras coloridas indicam as variações das constantes de dissociação típicas de várias classes de interações nos sistemas biológicos. Poucas interações, como as que ocorrem entre a proteína avidina e o cofator enzimático biotina, estão fora das variações normais. A interação biotina-avidina é tão forte que pode ser considerada irreversível. As interações proteína-DNA sequência-específicas refletem proteínas que se ligam a uma sequência nucleotídica específica no DNA, em oposição à ligação não específica a qualquer sítio no ácido nucleico.

* Uma constante de dissociação registrada é válida somente para as condições particulares da solução sob as quais foi medida. Os valores de $K_d$ para uma interação proteína-ligante podem ser alterados, às vezes em várias ordens de magnitude, por mudanças na concentração salina da solução, no pH, ou por outras por variáveis.

† Esta imunoglobulina foi isolada como parte do esforço para desenvolver uma vacina contra o HIV. As imunoglobulinas (descritas adiante no capítulo) são altamente variáveis e a $K_d$ registrada aqui não deve ser considerada uma característica de todas as imunoglobulinas.

‡ A calmodulina tem quatro sítios de ligação para o cálcio. Os valores mostrados refletem os sítios de ligação com a menor e a maior afinidade observadas em um conjunto de medidas.

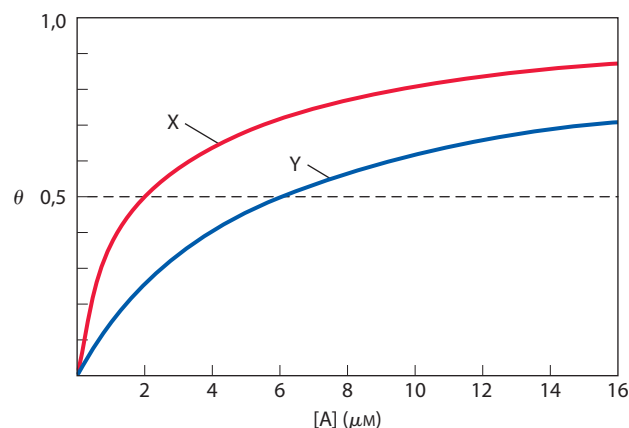
$$[PL] = \frac{[P][L]}{K_d} \qquad (5\text{-}7)$$

$$\theta = \frac{[L]}{[L] + K_d} \qquad (5\text{-}8)$$

Quando [L] for igual a $K_d$, metade dos sítios estará ocupada. À medida que [L] cai abaixo de $K_d$, cada vez menos proteínas terão ligantes associados. A [L] deve ser nove vezes maior do que $K_d$ para que sejam ocupados 90% dos sítios disponíveis.

Na prática, $K_d$ é usado muito mais frequentemente do que $K_a$ para expressar a afinidade de uma proteína por um ligante. Observe que um valor mais baixo de $K_d$ corresponde a uma afinidade mais alta do ligante pela proteína. A matemática pode ser reduzida às afirmações simples: $K_d$ é equivalente à concentração molar do ligante na qual a metade dos sítios de interação está ocupada. Nesse ponto, diz-se que a proteína alcançou a metade da saturação com relação à interação com o ligante. Quanto maior a força da interação proteica com o ligante, mais baixa será a concentração necessária do ligante para que metade dos sítios seja ocupada, e assim mais baixo o valor de $K_d$. Na Tabela 5-1 estão algumas constantes de dissociação representativas; a escala mostra variações típicas das constantes de dissociação encontradas nos sistemas biológicos.

**PROBLEMA RESOLVIDO 5-1** **Constantes de dissociação receptor-ligante**

Duas proteínas, X e Y, interagem com o mesmo ligante, A, com as curvas de ligação mostradas abaixo.

Qual é a constante de dissociação, $K_d$, para cada proteína? Qual das proteínas (X ou Y) tem a maior afinidade pelo ligante A?

**Solução:** É possível determinar as constantes de dissociação pela análise do gráfico. Uma vez que $\theta$ representa a fração dos sítios de ligação ocupados pelo ligante, a concentração do ligante na qual a metade dos sítios está ocupada – isto é, o ponto onde a curva de ligação cruza a linha onde $\theta = 0{,}5$ – é a constante de dissociação. Para X, $K_d = 2\ \mu$M; para Y, $K_d = 6\ \mu$M. A proteína X tem maior afinidade pelo ligante, já que está semissaturada a uma [A] mais baixa.

A ligação do oxigênio à mioglobina segue os padrões discutidos anteriormente. No entanto, como o oxigênio é um gás, é necessário fazer alguns pequenos ajustes nas equações para que os experimentos no laboratório possam ser realizados de modo mais conveniente. Em primeiro lugar, substitui-se a concentração do oxigênio dissolvido pela [L], na Equação 5-8, a fim de obter

$$\theta = \frac{[O_2]}{[O_2] + K_d} \tag{5-9}$$

Visto que, para qualquer ligante, $K_d$ é igual a $[O_2]$ na qual a metade dos sítios de interação com o ligante está ocupada, ou $[O_2]_{0,5}$, a Equação 5-9 se torna

$$\theta = \frac{[O_2]}{[O_2] + [O_2]_{0,5}} \tag{5-10}$$

Em experimentos usando o oxigênio como ligante, o que varia é a pressão parcial do oxigênio ($pO_2$) na fase gasosa sobre a solução, pois isso é mais fácil de medir do que a concentração do $O_2$ dissolvido na solução. A concentração de uma substância volátil em solução é sempre proporcional à pressão parcial local do gás. Assim, definindo a pressão parcial do oxigênio na $[O_2]_{0,5}$ como $P_{50}$, a substituição na Equação 5-10 nos dá

$$\theta = \frac{pO_2}{pO_2 + P_{50}} \tag{5-11}$$

A Figura 5-4b apresenta uma curva de interação para a mioglobina que relaciona $\theta$ com $pO_2$.

## A estrutura da proteína afeta a forma de interação com o ligante

A interação entre ligante e proteína raramente é tão simples como sugerem as equações apresentadas. A interação é muito afetada pela estrutura da proteína e com frequência é acompanhada por mudanças conformacionais. Por exemplo, a especificidade com a qual o heme interage com seus diversos ligantes é alterada quando ele é um componente da mioglobina. O monóxido de carbono se liga a três moléculas de heme livre mais de 20.000 vezes melhor do que o $O_2$ (isto é, o $K_d$ ou a $P_{50}$ para a ligação do CO ao heme livre é mais de 20.000 vezes mais baixo do que para o $O_2$), mas ele se liga somente 200 vezes melhor do que o $O_2$ quando o heme está ligado à mioglobina. A diferença pode ser parcialmente explicada por impedimento estérico. Quando o $O_2$ se liga ao heme livre, o eixo da molécula do oxigênio é posicionado em um ângulo em relação à ligação Fe—O (**Figura 5-5a**). Em contrapartida, quando o CO se liga ao heme livre, os átomos de Fe, C e O se posicionam em linha reta (Figura 5-5b). Em ambos os casos, a ligação reflete a geometria dos orbitais híbridos em cada ligante. Na mioglobina, a His[64] (His E7), no lado do heme onde o $O_2$ se liga, está longe demais para coordenar com o ferro do heme, mas se relaciona com o ligante que estiver interagindo com o heme. Esse resíduo, chamado de *His distal* (para distinguir de *His proximal*, His F8), forma uma ligação de hidrogênio com o $O_2$ (Figura 5-5c), mas pode ajudar a impedir a ligação linear do CO, o que explica a redução seletiva na ligação do CO ao heme na mioglobina (e na hemoglobina). Uma redução na ligação do CO é fisiologicamente importante, pois este gás é um subproduto pobre do metabolismo celular. Outros fatores, ainda não bem definidos, também podem modular a interação do heme com o CO nessas proteínas.

**FIGURA 5-5 Efeitos estéricos causados pela interação do ligante ao heme da mioglobina.** **(a)** O oxigênio liga-se ao heme com o seu eixo formando um ângulo, uma conformação de ligação facilmente ajustada pela mioglobina. **(b)** O monóxido de carbono liga-se ao heme livre com seu eixo perpendicular ao plano do anel porfirínico. O CO, quando ligado ao heme na mioglobina, é forçado a adotar um ângulo inadequado porque o arranjo perpendicular é bloqueado estericamente pela His E7, a His distal. Este efeito enfraquece a ligação do CO à mioglobina. **(c)** Outra visão do heme da mioglobina (derivada de PDB ID 1MBO) mostrando o arranjo dos resíduos dos aminoácidos-chave ao redor do heme. O oxigênio liga-se por uma ligação de hidrogênio à His distal, His E7 (His[64]), facilitando a posterior ligação de $O_2$.

A ligação do $O_2$ ao heme da mioglobina também depende dos movimentos moleculares, ou “respirações”, na estrutura da proteína. A molécula de heme está profundamente enterrada no polipeptídeo dobrado, sem um caminho direto para o trânsito do oxigênio da solução circundante para o sítio de interação com o ligante. Se a proteína fosse rígida, o $O_2$ não entraria ou sairia do bolsão do heme em uma taxa

mensurável. Contudo, a flexibilização molecular rápida das cadeias laterais dos aminoácidos gera cavidades transitórias na estrutura da proteína, e o $O_2$ entra e sai movendo-se através dessas cavidades. Simulações em computador de flutuações estruturais rápidas na mioglobina sugerem que existem muitas dessas vias. Uma das principais é gerada pela rotação da cadeia lateral da His distal ($His^{64}$), que ocorre em uma escala de tempo de nanossegundo ($10^{-9}$ s). Mesmo mudanças conformacionais sutis podem ser críticas para a atividade da proteína.

Na neuroglobina, citoglobina e em algumas globinas encontradas em plantas e invertebrados, a His distal (His E7) está coordenada diretamente com o ferro do heme. Nessas globinas, o oxigênio ou outros ligantes devem deslocar a His distal no processo de ligação.

## A hemoglobina transporta oxigênio no sangue

**Proteínas de ligação ao oxigênio-hemoglobina: transporte de oxigênio**

Quase todo o oxigênio carregado pelo sangue total em animais está ligado à hemoglobina e é transportado por ela nos eritrócitos. Os eritrócitos humanos normais são pequenos discos bicôncavos (6 a 9 $\mu$m de diâmetro), formados a partir de células-tronco precursoras, chamadas de **hemocitoblastos**. No processo de maturação, a célula-tronco produz células-filhas que produzem grandes quantidades de hemoglobina, perdendo em seguida suas organelas intracelulares – núcleo, mitocôndrias e retículo endoplasmático. Os eritrócitos são, portanto, células vestigiais, incompletas, incapazes de se reproduzir e, nos humanos, destinadas a viver por somente 120 dias. Sua principal função é carregar hemoglobina dissolvida no citosol em concentração muito alta (~34% do peso total).

A hemoglobina está cerca de 96% saturada com oxigênio no sangue arterial que passa dos pulmões, pelo coração até os tecidos periféricos. No sangue venoso que retorna ao coração, ela está somente cerca de 64% saturada. Assim, cada 100 mL de sangue que banha um tecido libera um terço do oxigênio que carrega, ou 6,5 mL de $O_2$ gasoso, na pressão atmosférica e na temperatura corporal.

A mioglobina, com sua curva hiperbólica de ligação ao oxigênio (Figura 5-4b), é relativamente insensível a pequenas alterações na concentração do oxigênio dissolvido e, por isso, funciona bem como proteína de armazenamento de oxigênio. A hemoglobina, com suas múltiplas subunidades e sítios de ligação para o $O_2$, é mais adequada para o transporte do oxigênio. Conforme será visto, as interações entre as subunidades de uma proteína multimérica permitem uma resposta altamente sensível a pequenas alterações na concentração do ligante. As interações entre as subunidades da hemoglobina causam mudanças conformacionais que alteram a afinidade da proteína pelo oxigênio. A modulação da ligação do oxigênio permite que a proteína de transporte de $O_2$ responda a alterações na demanda de oxigênio pelos tecidos.

## As subunidades da hemoglobina têm estrutura semelhante à da mioglobina

A hemoglobina ($M_r$ 64.500; abreviada Hb) é aproximadamente esférica, com diâmetro de quase 5,5 nm. É uma proteína tetramérica, contendo quatro grupos prostéticos heme, cada um associado com uma cadeia polipeptídica. A

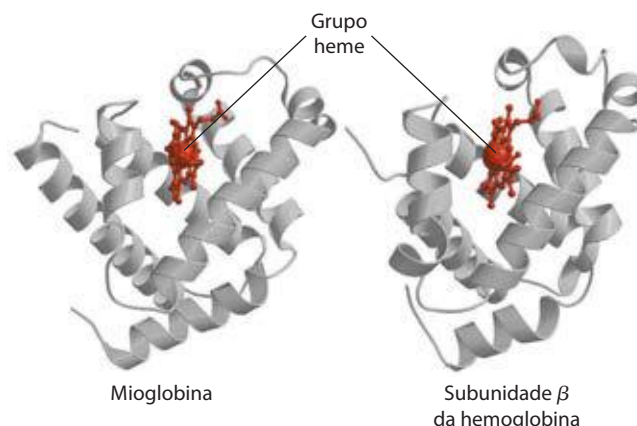



**FIGURA 5-6** Comparação entre a estrutura da mioglobina (PDB ID 1MBO) e a da subunidade $\beta$ da hemoglobina (derivada de PDB ID 1HGA).

hemoglobina do adulto contém dois tipos de globina, duas cadeias $\alpha$ (com 141 resíduos cada uma) e duas cadeias $\beta$ (com 146 resíduos cada uma). Apesar de menos da metade dos resíduos de aminoácidos ser idêntica na sequência polipeptídica das subunidades $\alpha$ e $\beta$, a estrutura tridimensional dos dois tipos de subunidades é muito semelhante. Além disso, sua estrutura é muito semelhante à da mioglobina (**Figura 5-6**), apesar de a sequência de aminoácidos dos três polipeptídeos ser idêntica apenas em 27 posições (**Figura 5-7**). Os três polipeptídeos são membros da família proteica das globinas. A convenção para a denominação de hélice, descrita para a mioglobina, também se aplica para os polipeptídeos da hemoglobina, exceto pelo fato de a subunidade $\alpha$ não ter a hélice curta D. O bolsão de ligação ao heme é composto na maior parte pelas hélices E e F em cada uma das subunidades.

A estrutura quaternária da hemoglobina caracteriza interações fortes entre as subunidades diferentes. A interface $\alpha_1\beta_1$ (e seu complemento $\alpha_2\beta_2$) envolve mais de 30 resíduos, e sua interação é suficientemente forte para que esses dímeros $\alpha\beta$ permaneçam intactos mesmo que o tratamento suave da hemoglobina com ureia separe o tetrâmero nos dímeros. A interface $\alpha_1\beta_2$ (e $\alpha_2\beta_1$) envolve 19 resíduos (**Figura 5-8**). As interações hidrofóbicas predominam em todas as interfaces, mas existem também muitas ligações de hidrogênio e alguns pares iônicos (ou pontes salinas) cuja importância será discutida adiante.

## A hemoglobina sofre mudança estrutural quando se liga ao oxigênio

A análise por raios X revelou duas conformações principais da hemoglobina: o **estado R** e o **estado T**. Embora o oxigênio se ligue à hemoglobina nos dois estados, ele tem muito mais afinidade pela proteína no estado R. A ligação do oxigênio estabiliza o estado R. Experimentalmente, quando o oxigênio não está presente, o estado T é mais estável, e é, assim, a conformação predominante da **desoxiemoglobina**. Originalmente, T e R significavam "tenso" e "relaxado", pois o estado T é estabilizado por um número maior de pares iônicos, muitos dos quais ficam na interface $\alpha_1\beta_2$ (e $\alpha_2\beta_1$) (**Figura 5-9**). A ligação do $O_2$ à subunidade da

**FIGURA 5-7 A sequência de aminoácidos da mioglobina de baleia e das cadeias $\alpha$ e $\beta$ da hemoglobina humana.** As linhas tracejadas assinalam os limites das hélices. Para um alinhamento ótimo, pequenas lacunas tiveram que ser introduzidas nas duas sequências da Hb, onde haviam aminoácidos presentes nas sequências usadas na comparação. Com exceção da hélice D que não existe na Hb$\alpha$, esse alinhamento permite o uso da convenção de letras das hélices que enfatiza o posicionamento comum dos resíduos de aminoácidos que são idênticos nas três estruturas (sombreados). Os resíduos sombreados em cor salmão são conservados em todas as globinas conhecidas. Observe que a designação comum de letras e números das hélices para os aminoácidos não corresponde necessariamente a uma posição comum na sequência linear de aminoácidos nos polipeptídeos. Por exemplo, o resíduo His distal é His E7 nas três estruturas, mas corresponde a $His^{64}$, $His^{68}$ e $His^{63}$ nas sequências lineares de Mb, Hb$\alpha$ e Hb$\beta$, respectivamente. Os resíduos não helicoidais nas extremidades carboxi e amino, além do primeiro (A) e do último (H) segmento $\alpha$-helicoidal, estão assinalados com NA e HC, respectivamente.

**FIGURA 5-8 Interações dominantes entre as subunidades da hemoglobina.** (PDB ID 1HGA) Nesta representação, as subunidades $\alpha$ estão em cinza-claro e as subunidades $\beta$ estão em cinza-escuro. As interações mais fortes (destacadas) ocorrem entre subunidades diferentes. Quando o oxigênio se liga, o contato $\alpha_1\beta_1$ se altera um pouco, mas existe uma grande alteração no contato $\alpha_1\beta_2$, com o rompimento de vários pares iônicos.

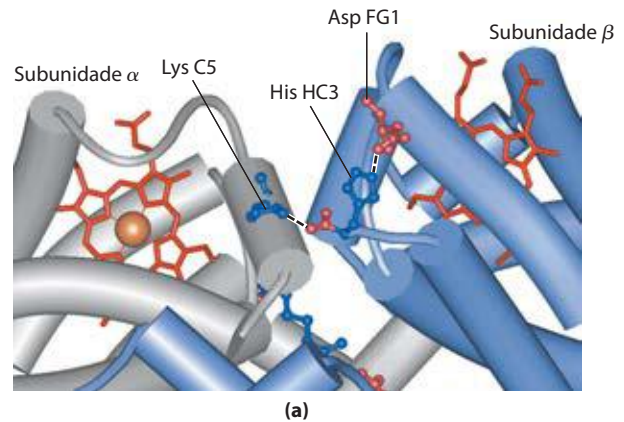
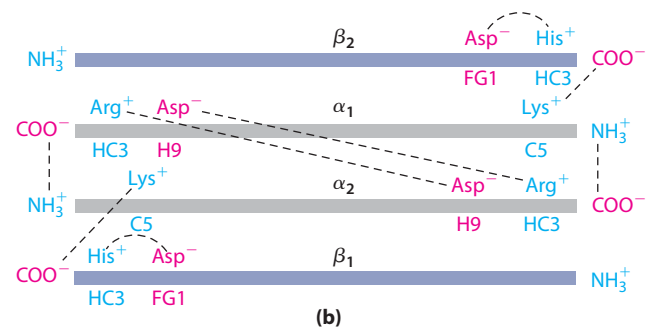



**FIGURA 5-9 Alguns pares iônicos que estabilizam o estado T da desoxiemoglobina. (a)** Visão de perto de uma porção da molécula da desoxiemoglobina no estado T (PDB ID 1HGA). As interações entre os pares iônicos His HC3 e Asp FG1 da subunidade $\beta$ (em azul) e entre Lys C5 da subunidade $\alpha$ (em cinza) e His HC3 (seu grupo $\alpha$-carboxílico) da subunidade $\beta$ estão indicadas com linhas tracejadas. (Lembre que HC3 é o resíduo carboxiterminal da subunidade $\beta$.) **(b)** As interações entre estes pares iônicos e entre outros não mostrados em (a) estão esquematizadas nesta representação das cadeias polipeptídicas estendidas da hemoglobina.

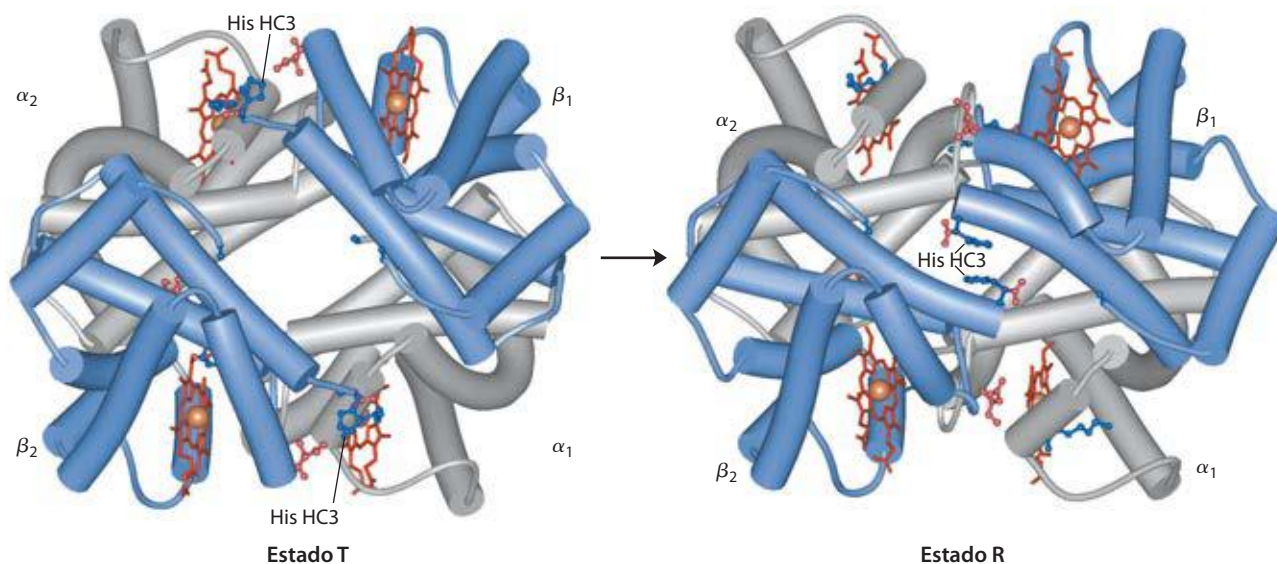



**FIGURA 5-10 A transição T → R.** (PDB ID 1HGA e 1BBB) Nesta representação da desoxiemoglobina, as subunidades $\beta$ estão em azul e as subunidades $\alpha$ estão em cinza, como na Figura 5-9. Cadeias laterais carregadas positivamente e cadeias terminais envolvidas em pares iônicos estão mostradas em azul, e suas parceiras carregadas negativamente, em vermelho. A Lys C5 de cada subunidade $\alpha$ e a Asp FG1 de cada subunidade $\beta$ são visíveis, mas não estão marcadas (compare com a Figura 5-9a). Observe que a molécula está com orientação ligeiramente diferente da Figura 5-9. A transição do estado T para o estado R altera de modo considerável os pares de subunidades, afetando determinados pares iônicos. Mais perceptivelmente, os resíduos de His HC3 na extremidade carboxiterminal das subunidades $\beta$ que, no estado T, estão envolvidos em pares iônicos, no estado R sofrem rotação em direção ao centro da molécula, onde não estão mais em pares iônicos. Outro resultado significativo da transição T → R é um estreitamento do bolsão entre as subunidades $\beta$.

hemoglobina no estado T desencadeia uma mudança na conformação para o estado R. Quando toda a proteína sofre essa transição, a estrutura das subunidades individuais se altera pouco, mas os pares de subunidades $\alpha\beta$ deslizam um sobre o outro e sofrem rotação, estreitando o bolsão entre as subunidades $\beta$ (**Figura 5-10**). Nesse processo, alguns dos pares iônicos que estabilizam o estado T são rompidos e alguns novos são formados.

Max Perutz propôs que a transição T → R é desencadeada por mudanças na posição de cadeias laterais de aminoácidos-chave que circundam o heme. No estado T, a porfirina é levemente pregueada, fazendo com que o ferro do heme projete-se um pouco para o lado da His proximal (His F8). A ligação do $O_2$ faz o heme assumir uma posição mais planar, deslocando a posição da His proximal e da hélice F ligada (**Figura 5-11**). Essas mudanças levam a ajustes nos pares iônicos na interface $\alpha_1\beta_2$.

## A hemoglobina se liga ao oxigênio de forma cooperativa

A hemoglobina deve se ligar com eficiência ao oxigênio nos pulmões – onde a $pO_2$ é cerca de 13,3 kPa – e liberá-lo nos tecidos, onde a $pO_2$ é de 4 kPa. A mioglobina, ou qualquer proteína que se ligue ao oxigênio com uma curva de ligação hiperbólica, é mal adaptada para essa função, pelo motivo ilustrado na **Figura 5-12**. A proteína que se liga ao $O_2$ com alta afinidade capta oxigênio de maneira eficiente nos pulmões, mas não o libera muito nos tecidos. Por sua vez, se a proteína se liga ao oxigênio com afinidade suficientemente baixa para liberá-lo nos tecidos, não o capta muito nos pulmões.

A hemoglobina resolve o problema passando por uma transição de um estado de baixa afinidade (o estado T) para um de alta afinidade (o estado R) à medida que mais moléculas de $O_2$ vão sendo ligadas. Como resultado, a hemoglobina tem uma curva de ligação ao oxigênio híbrida em forma de S, ou sigmoide (Figura 5-12). Proteínas com uma única cadeia polipeptídica com um único sítio de ligação não geram uma curva de ligação sigmoide – mesmo se a ligação produzir uma mudança de conformação –, porque cada molécula do ligante interage de modo independente e não afeta a interação de outra molécula. Em contrapartida, a ligação do $O_2$ às subunidades individuais da hemoglobina pode alterar a afinidade nas subunidades adjacentes. A primeira molécula de $O_2$ que interage com a desoxiemoglobina o faz

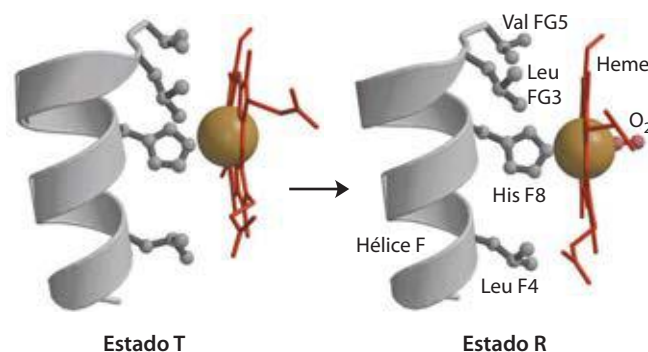



**FIGURA 5-11 Mudanças de conformação próximas ao heme pela ligação do $O_2$ à desoxiemoglobina.** (Derivado de PDB ID 1HGA e 1BBB) Acredita-se que a alteração da posição da hélice F quando o heme se liga ao $O_2$ seja um dos ajustes que desencadeia a transição T → R.

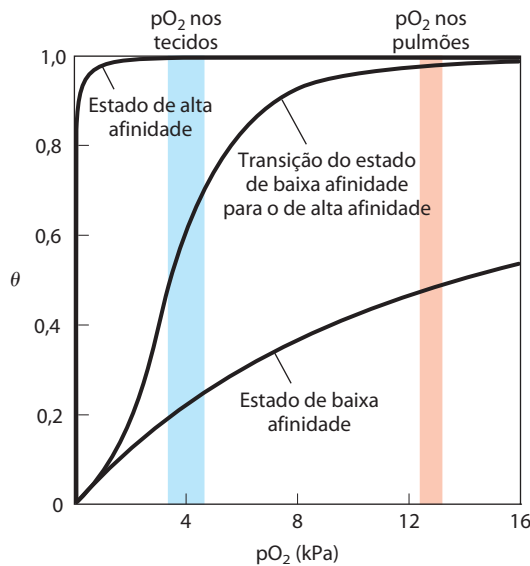



**FIGURA 5-12 Curva sigmoide de ligação (cooperativa).** A curva sigmoide de ligação pode ser vista como uma curva híbrida que reflete a transição de um estado de baixa afinidade para um de alta afinidade. Devido a sua ligação cooperativa, evidenciada por uma curva sigmoide, a hemoglobina é mais sensível às pequenas diferenças na concentração de $O_2$ entre os tecidos e os pulmões, o que lhe permite se ligar ao oxigênio nos pulmões (onde a $pO_2$ é alta) e liberá-lo nos tecidos (onde a $pO_2$ é baixa).

fracamente, pois se liga a uma subunidade no estado T. Sua ligação, contudo, leva a mudanças conformacionais transferidas às subunidades adjacentes, facilitando a ligação de moléculas adicionais de $O_2$. De fato, a transição T → R ocorre mais facilmente na segunda subunidade depois da ligação do $O_2$ à primeira subunidade. A última (quarta) molécula de $O_2$ se liga ao heme de uma subunidade que já está no estado R, e por isso se liga com afinidade muito mais alta do que a primeira.

Uma **proteína alostérica** é aquela em que a interação com um ligante em um sítio afeta as propriedades de ligação de outro sítio na mesma proteína. O termo "alostérico" deriva do grego *allos,* "outro", e *stereos,* "sólido" ou "forma". Proteínas alostéricas são as que têm "outras formas", ou conformações, induzidas pela interação com ligantes denominados moduladores. A mudança conformacional induzida pelo(s) modulador(es) interconverte formas mais ativas e menos ativas da proteína. Os moduladores das proteínas alostéricas podem ser inibidores ou ativadores. Quando o ligante normal e o modulador são idênticos, a interação é chamada de **homotrópica**. Quando o modulador é uma molécula diferente do ligante normal, a interação é **heterotrópica**. Algumas proteínas têm dois ou mais moduladores e, em função disso, podem participar de interações homotrópicas e heterotrópicas.

A interação cooperativa de um ligante com uma proteína multimérica, como observado com a ligação do $O_2$ à hemoglobina, é uma forma de ligação alostérica. A interação de um ligante afeta a afinidade de qualquer sítio de ligação ainda não ocupado, e o $O_2$ pode ser considerado como ligante e modulador homotrópico ativador. Existe apenas um sítio de ligação para o $O_2$ em cada subunidade, de forma que os efeitos alostéricos que dão origem à cooperatividade são mediados por mudanças conformacionais transmitidas de uma subunidade à outra por interações subunidade-subunidade. Uma curva sigmoide é sinal de ligação cooperativa. Ela permite uma resposta muito mais sensível à concentração do ligante, sendo importante para a função de muitas proteínas multiméricas. O princípio da alosteria também se aplica às enzimas reguladoras, como será visto no Capítulo 6.

As mudanças conformacionais cooperativas dependem de variações na estabilidade estrutural de diferentes partes da proteína, conforme descrito no Capítulo 4. Os sítios de ligação de uma proteína consistem em segmentos estáveis próximos a segmentos relativamente instáveis, sendo os últimos capazes de mudanças frequentes na conformação ou de desordem intrínseca (**Figura 5-13**).

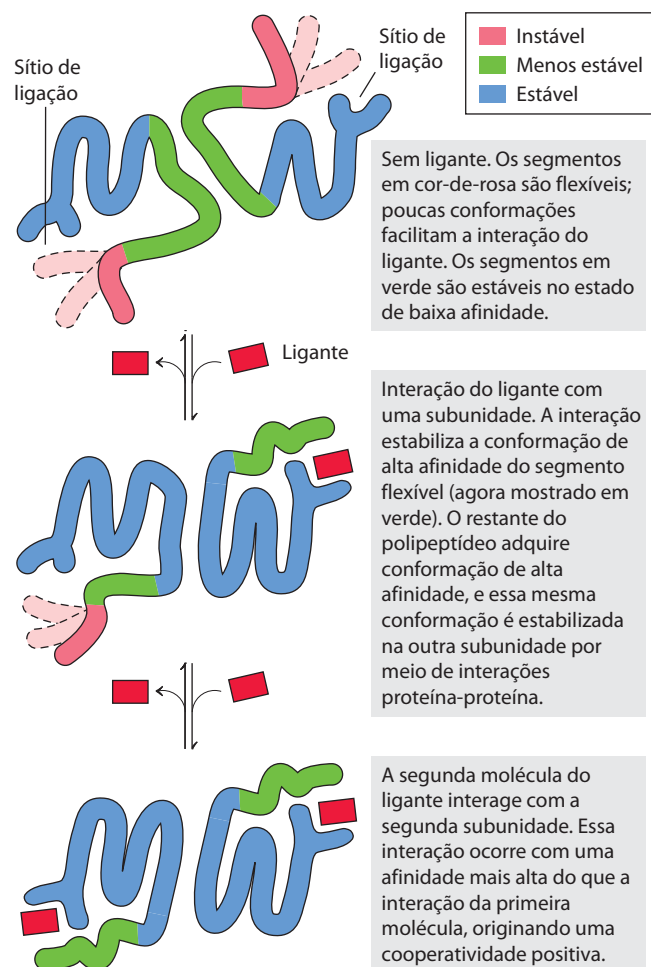



**FIGURA 5-13 Mudanças estruturais em uma proteína multimérica no processo de interação cooperativa com o ligante.** A estabilidade estrutural não é uniforme em toda a molécula da proteína. Aqui está mostrada uma proteína dimérica hipotética, com regiões de alta (em azul), média (em verde) e baixa (em vermelho) estabilidade. Os sítios de interação com o ligante são formados por segmentos de alta e baixa estabilidade, de forma que a afinidade pelo ligante é relativamente baixa. As mudanças conformacionais que ocorrem pela interação com o ligante transformam a proteína de um estado de baixa afinidade para um de alta afinidade, uma forma de encaixe induzido.

No momento da interação com o ligante, as partes móveis do sítio de ligação na proteína devem ser estabilizadas em uma conformação particular, afetando a conformação das subunidades polipeptídicas adjacentes. Se o sítio de ligação como um todo fosse altamente estável, poucas mudanças estruturais ocorreriam nesse sítio ou seriam propagadas para outras partes da proteína após a interação com o ligante.

Como no caso da mioglobina, outros ligantes, além do oxigênio, podem interagir com a hemoglobina. Um exemplo importante é o CO, que interage 250 vezes melhor com a proteína do que o $O_2$. A exposição humana ao CO pode ter consequências trágicas (Quadro 5-1).

## A interação cooperativa do ligante pode ser descrita em termos quantitativos

A ligação cooperativa do oxigênio pela hemoglobina foi analisada pela primeira vez por Archibald Hill, em 1910. Desse trabalho, surgiu a abordagem geral para o estudo da interação cooperativa de ligantes com proteínas multiméricas.

Para uma proteína com $n$ sítios de ligação, o equilíbrio da Equação 5-1 torna-se

$$\mathrm{P} + n\mathrm{L} \rightleftharpoons \mathrm{PL}_n \qquad (5\text{-}12)$$

e a expressão para a constante de associação torna-se

$$K_a = \frac{[\mathrm{PL}_n]}{[\mathrm{P}][\mathrm{L}]^n} \qquad (5\text{-}13)$$

A expressão para $\theta$ (ver Equação 5-8) é

$$\theta = \frac{[\mathrm{L}]^n}{[\mathrm{L}]^n + K_d} \qquad (5\text{-}14)$$

Rearranjar e então tomar o log em ambos os lados resulta em

$$\frac{\theta}{1-\theta} = \frac{[\mathrm{L}]^n}{K_d} \qquad (5\text{-}15)$$

$$\log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) = n \log [\mathrm{L}] - \log K_d \qquad (5\text{-}16)$$

em que $K_d = [\mathrm{L}]^n_{0,5}$.

A Equação 5-16 é a **equação de Hill**, e uma curva do log $[\theta/(1-\theta)]$ *versus* log [L] é chamada de **curva de Hill**. Com base na equação, a curva de Hill deveria ter uma inclinação de $n$. Contudo, a inclinação determinada experimentalmente na verdade não reflete o número de sítios de ligação, mas o grau de interação entre eles. A inclinação de uma curva de Hill é, por isso, denominada $n_H$, o **coeficiente de Hill**, que é a medida do grau de cooperatividade. Se $n_H$ for igual a 1, a interação com o ligante não é cooperativa, situação que pode surgir mesmo em uma proteína multimérica se as subunidades não se comunicam. Um $n_H$ maior que 1 indica cooperatividade positiva. Essa é a situação observada na hemoglobina, na qual a interação com uma molécula do ligante facilita a interação de outras. O limite superior teórico para $n_H$ é alcançado quando $n_H = n$. Nesse caso, a ligação é completamente cooperativa: todos os sítios de ligação na proteína serão ocupados com os ligantes de maneira simultânea, e não haverá, em nenhuma situação, proteínas parcialmente saturadas. Esse limite nunca é alcançado na prática, e o valor de $n_H$ é sempre menor do que o número real de sítios de ligação na proteína.

Um $n_H$ menor que 1 indica cooperatividade negativa, na qual a interação de uma molécula de ligante *impede* a interação de outras. São raros os casos bem documentados de cooperatividade negativa.

Para adaptar a equação de Hill à ligação do oxigênio com a hemoglobina é preciso substituir novamente [L] por $pO_2$ e $K_d$ por $P^n_{50}$:

$$\log\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) = n \log pO_2 - n \log P_{50} \qquad (5\text{-}17)$$

As curvas de Hill para a mioglobina e a hemoglobina estão apresentadas na **Figura 5-14**.

## Dois modelos sugerem mecanismos para a ligação cooperativa

Os bioquímicos têm hoje muitas informações sobre os estados T e R da hemoglobina, mas muito ainda permanece para ser estudado sobre como ocorre a transição T → R. Dois modelos para a interação cooperativa de ligantes a proteínas com múltiplos sítios de ligação têm influenciado muito as considerações sobre esse problema.

O primeiro modelo foi proposto por Jacques Monod, Jeffries Wyman e Jean-Pierre Changeux, em 1965, sendo chamado de **modelo MWC** ou **modelo combinado** (**Figura 5-15a**). Esse modelo presume que as subunidades de uma proteína de ligação cooperativa são funcionalmente idênticas, que cada subunidade pode existir em (pelo menos) duas conformações, e que todas as subunidades

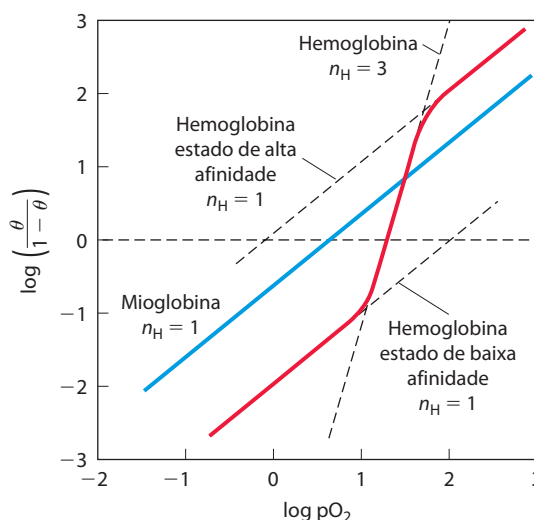



**FIGURA 5-14 Curvas de Hill para a ligação do oxigênio à mioglobina e à hemoglobina.** Quando $n_H = 1$, não há cooperatividade evidente. O grau máximo de cooperatividade observado para a hemoglobina corresponde a cerca de $n_H = 3$. Observe que embora isto indique um alto nível de cooperatividade, $n_H$ é menor que $n$, que é o número de sítios de ligação para o $O_2$ na hemoglobina. Isto é normal para uma proteína que exibe comportamento alostérico de ligação.

## QUADRO 5-1  MEDICINA Monóxido de carbono: um assassino furtivo

Lago Powell, Arizona, agosto de 2000. Uma família estava aproveitando suas férias em uma casa-barco alugada quando o gerador de eletricidade foi ligado para fazer funcionar um aparelho de ar-condicionado e um televisor. Quinze minutos mais tarde, dois irmãos, com 8 e 11 anos, pularam do convés da popa para nadar. A abertura do exaustor do gerador estava situada imediatamente abaixo do convés, espaço onde os dois foram nadar. Em dois minutos, os dois meninos foram envolvidos pelo monóxido de carbono que havia se concentrado no espaço abaixo do convés. Os dois se intoxicaram e morreram afogados. Essas mortes, juntamente com uma série de outras mortes ocorridas na década de 1990, que tinham ligação com casas-barco de modelo semelhante, levaram por fim ao recolhimento e à reestruturação da montagem do exaustor do gerador.

O monóxido de carbono (CO), gás incolor e inodoro, é responsável por mais da metade das mortes anuais por envenenamento no mundo. Tem uma afinidade pela hemoglobina 250 vezes maior do que a do oxigênio. Em consequência, níveis relativamente baixos de CO podem ter efeitos substanciais e trágicos. O complexo formado pela ligação do CO à hemoglobina é chamado de carboxiemoglobina, ou COHb.

Pequena parte do CO é produzida por processos naturais, mas altos níveis localizados geralmente resultam de atividade humana. Motores e exaustores de caldeiras são fontes importantes, já que o CO é um subproduto da combustão incompleta de combustíveis fósseis. Somente nos Estados Unidos, cerca de 4.000 pessoas morrem por envenenamento por CO por ano, de modo acidental ou intencional. Muitas das mortes acidentais envolvem a produção não detectada de CO em ambientes fechados, por mau funcionamento ou vazamento de caldeiras domésticas, liberando a substância dentro de casa. No entanto, o envenenamento também pode ocorrer em espaços abertos, quando pessoas desavisadas inalam o CO do escapamento de geradores, motores de popa, motores de tratores, veículos de recreação ou aparadores de grama.

Os níveis de CO na atmosfera raramente são perigosos, variando de menos de 0,05 parte por milhão (ppm) em áreas não habitadas e remotas até 3 a 4 ppm em algumas cidades do hemisfério norte. Nos Estados Unidos, o limite de CO determinado pelo governo (Occupational Safety and Health Administration [OSHA]) em locais de trabalho é de 50 ppm por pessoa por turno de oito horas. A forte ligação do CO à hemoglobina indica que a COHb pode acumular-se ao longo do tempo, quando as pessoas são expostas a uma fonte constante e de baixo nível de CO.

Em média, em indivíduos saudáveis, menos de 1% da hemoglobina total está complexada como COHb. Uma vez que o CO é um produto da fumaça do tabaco, muitos fumantes têm níveis de COHb na faixa de 3 a 8% do total da hemoglobina, podendo aumentar para 15% nos fumantes inveterados. Os níveis de COHb equilibram-se em 50% nas pessoas que respiram ar contendo 570 ppm de CO por várias horas. Métodos confiáveis foram desenvolvidos para relacionar o conteúdo de CO na atmosfera com os níveis de COHb no sangue (Figura Q-1). Testes com casas-barco com escapamento do gerador semelhante ao responsável pelas mortes no Lago Powell mostraram níveis de CO alcançando de 6.000 a 30.000 ppm sob o convés, e níveis de $O_2$ sendo reduzidos de 21 para 12% no mesmo local. Mesmo acima do convés foram detectados níveis de CO de 7.200 ppm, suficientemente altos para causar morte em poucos minutos.

Como uma pessoa é afetada pela COHb? Em níveis de menos de 10% do total de hemoglobina, raramente se observam sintomas. Em 15%, o indivíduo sente dor de cabeça leve. Em 20 a 30%, a dor de cabeça é forte

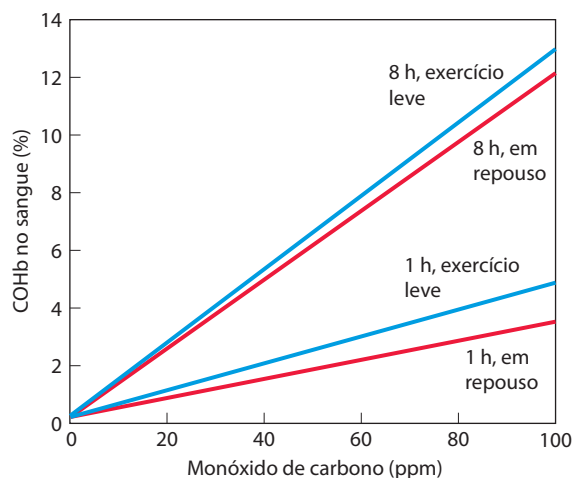



**FIGURA Q-1** Relação entre os níveis de COHb no sangue e a concentração de CO no ar ambiente. São mostradas quatro condições diferentes, comparando-se os efeitos de exposição breve *versus* exposição prolongada e exposição em repouso *versus* exposição durante exercício leve.

sofrem transição de uma conformação para a outra simultaneamente. Nesse modelo, nenhuma proteína tem subunidades em conformações diferentes. As duas conformações estão em equilíbrio. O ligante pode interagir com ambas as conformações, mas interage com cada uma com afinidade diferente. A interação sucessiva das moléculas do ligante à conformação de baixa afinidade (mais estável na ausência do ligante) torna mais provável a transição para a conformação de alta afinidade.

No segundo modelo, o **modelo sequencial** (Figura 5-15b), proposto em 1966 por Daniel Koshland e colaboradores, a interação com o ligante pode induzir uma mudança de conformação em uma subunidade individual. Essa mudança provoca uma alteração similar em uma subunidade

e geralmente acompanhada por náusea, tontura, confusão, desorientação e alguns distúrbios visuais; esses sintomas costumam ser reversíveis pelo tratamento com oxigênio. Em níveis de COHb de 30 a 50%, os sintomas neurológicos tornam-se mais graves, e em níveis próximos de 50%, o indivíduo perde a consciência e pode entrar em coma. Pode seguir-se deficiência respiratória. Com a exposição prolongada, alguns danos tornam-se permanentes. A morte normalmente ocorre quando os níveis de COHb ultrapassam 60%. A necropsia nos meninos que morreram no Lago Powell revelou níveis de COHb de 59 e 52%.

A ligação do CO à hemoglobina é afetada por muitos fatores, incluindo exercício (Figura Q-1) e mudanças na pressão atmosférica relacionadas com a altitude. Devido aos seus níveis basais de COHb mais altos, os fumantes expostos a uma fonte de CO com frequência apresentam sintomas mais rapidamente do que os não fumantes. Os indivíduos com doenças cardíacas, pulmonares ou sanguíneas que reduzem a disponibilidade do oxigênio para os tecidos também podem experimentar sintomas em níveis mais baixos de exposição ao CO. Os fetos são particularmente mais suscetíveis ao risco de envenenamento por CO, pois a hemoglobina fetal tem uma afinidade pelo CO um pouco mais alta do que a hemoglobina do adulto. Têm sido relatados casos de exposição ao CO nos quais o feto morre, mas a mãe sobrevive.

Parece surpreendente que a perda da metade da nossa hemoglobina para a COHb possa ser fatal – sabe-se que as pessoas com qualquer uma das várias condições de anemia conseguem viver razoavelmente bem com metade do total de hemoglobina ativa. No entanto, a ligação do CO faz mais do que remover proteína do reservatório disponível para se ligar ao oxigênio. Ela também afeta a afinidade pelo oxigênio das subunidades remanescentes da hemoglobina. Quando o CO se liga a uma ou duas subunidades do tetrâmero da hemoglobina, a afinidade pelo $O_2$ é substancialmente aumentada nas subunidades restantes (Figura Q-2). Assim, o tetrâmero com duas moléculas de CO pode se ligar ao $O_2$ de modo eficiente nos pulmões – mas libera muito pouco nos tecidos. A privação do oxigênio nos tecidos torna-se grave rapidamente. Para aumentar o problema, os efeitos do CO não estão limitados à interferência com a função da hemoglobina. O CO liga-se a outras hemeproteínas e a uma grande variedade de metaloproteínas. As consequências dessas interações ainda não estão bem explicadas, mas podem ser responsáveis por alguns dos efeitos de longo prazo do envenenamento agudo, mas não fatal, por CO.

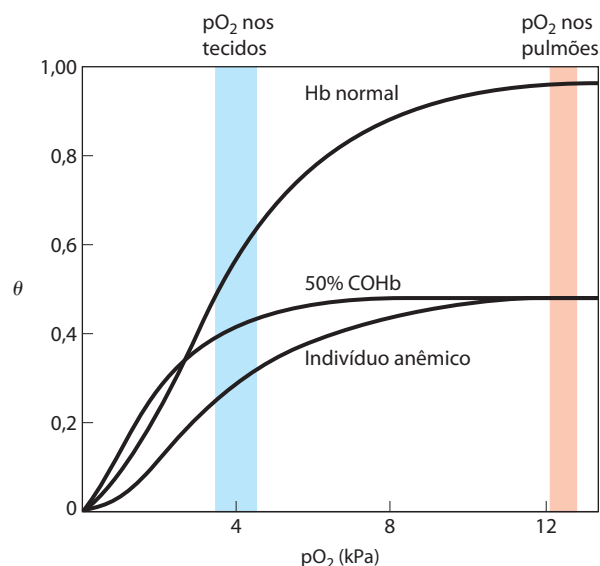



**FIGURA Q-2** Várias curvas de ligação do oxigênio: para hemoglobina normal, para hemoglobina de um indivíduo anêmico com somente 50% de sua hemoglobina funcional, e para hemoglobina de um indivíduo com 50% das subunidades ocupadas com CO. A $pO_2$ no pulmão e nos tecidos humanos está indicada.

Na suspeita de envenenamento por CO, é essencial que a pessoa seja levada para longe da fonte do gás, mas isso nem sempre resulta em recuperação rápida. Quando um indivíduo é removido de um local poluído com CO para uma atmosfera normal, o $O_2$ começa a substituir o CO na hemoglobina – mas os níveis de COHb diminuem muito lentamente, pois a meia-vida é de 2 a 6,5 horas, dependendo dos fatores ambientais. Porém, se forem administrados, por meio de uma máscara, 100% de oxigênio a uma pressão de 3 atm (303 kPa), a velocidade de troca pode ser aumentada em quatro vezes, e a meia-vida para a troca $O_2$-CO pode ser reduzida para algumas dezenas de minutos. Assim, o tratamento rápido por uma equipe médica adequadamente equipada é fundamental.

Os detectores de CO são altamente recomendados em todas as casas, sendo uma medida simples e barata para evitar possíveis tragédias.

adjacente, sendo mais provável a interação de uma segunda molécula do ligante. Existem mais estados intermediários possíveis nesse modelo do que no modelo combinado. Os dois não são mutuamente exclusivos; o modelo combinado pode ser visto como o caso restritivo "tudo ou nada" do modelo sequencial. No Capítulo 6, esses modelos serão utilizados para investigar as enzimas alostéricas.

## A hemoglobina também transporta $H^+$ e $CO_2$

Além de carregar praticamente todo o oxigênio de que as células necessitam dos pulmões para os tecidos, a hemoglobina transporta dois produtos finais da respiração celular – $H^+$ e $CO_2$ – dos tecidos para os pulmões e para os rins, onde são excretados. O $CO_2$, produzido pela oxidação

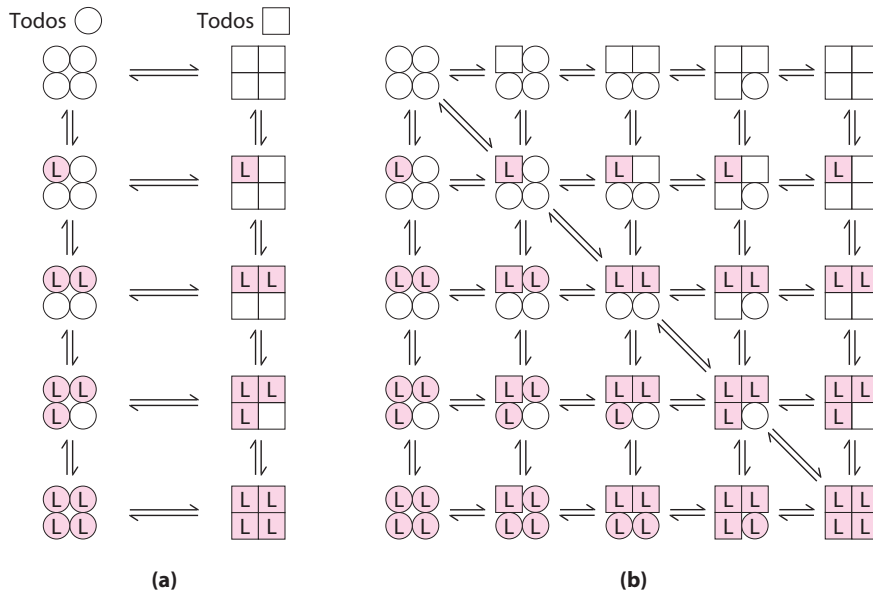



**FIGURA 5-15 Dois modelos gerais para a interconversão de formas inativas e ativas de uma proteína durante a interação cooperativa com o ligante.** Embora os modelos possam ser aplicados para qualquer proteína – incluindo qualquer enzima (Capítulo 6) – que exiba ligação cooperativa, aqui são mostradas quatro subunidades porque o modelo foi originalmente proposto para a hemoglobina. **(a)** No modelo combinado ou "tudo ou nada" (modelo MWC), postula-se que todas as subunidades estejam na mesma conformação, todas na forma ○ (baixa afinidade ou inativas) ou na forma □ (alta afinidade ou ativas). Dependendo do equilíbrio, $K_{eq}$, entre as formas ○ e □, a interação com uma ou mais moléculas do ligante (L) desviará o equilíbrio na direção da forma □. As subunidades que ligam L estão sombreadas. **(b)** No modelo sequencial, cada subunidade individual pode estar na forma ○ ou na forma □. Assim, é possível um grande número de conformações.

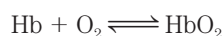
dos combustíveis orgânicos na mitocôndria, é hidratado e forma bicarbonato:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

Esta reação é catalisada pela **anidrase carbônica**, enzima particularmente abundante nos eritrócitos. O $CO_2$ não é muito solúvel em solução aquosa; é possível a formação de bolhas de $CO_2$ nos tecidos e no sangue se ele não for convertido em bicarbonato. Como pode-se observar pela reação catalisada pela anidrase carbônica, a hidratação do $CO_2$ resulta em aumento na concentração de $H^+$ (uma redução no pH) nos tecidos. A ligação do $O_2$ pela hemoglobina é profundamente influenciada pelo pH e pela concentração de $CO_2$, de forma que a conversão desse gás em bicarbonato é fundamental na regulação da ligação do oxigênio e sua liberação no sangue.

A hemoglobina transporta para os pulmões e para os rins cerca de 40% do total do $H^+$ e 15 a 20% do $CO_2$ formado nos tecidos – o restante do $H^+$ é absorvido pelo tampão bicarbonato do plasma e o restante do $CO_2$ é transportado como $HCO^-_3$ e $CO_2$ dissolvidos. A ligação do $H^+$ e do $CO_2$ tem uma relação inversa com a ligação do oxigênio. No pH relativamente baixo e na alta concentração de $CO_2$ dos tecidos periféricos, a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio diminui quando o $H^+$ e o $CO_2$ se ligam e o $O_2$ é liberado para os tecidos. Nos capilares do pulmão, ao contrário, quando o $CO_2$ é excretado e o pH do sangue consequentemente aumenta, a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio aumenta, e a proteína se liga a mais $O_2$ para transportar para os tecidos periféricos. Esse efeito do pH e da concentração de $CO_2$ sobre a ligação e a liberação do oxigênio pela hemoglobina é chamado de **efeito Bohr**, referência ao fisiologista dinamarquês que o descobriu em 1904, Christian Bohr, pai de Niels Bohr.

O equilíbrio da ligação para a hemoglobina e uma molécula de oxigênio pode ser designado pela reação

$$Hb + O_2 \rightleftharpoons HbO_2$$

mas essa não é uma relação completa. Para considerar o efeito da concentração do $H^+$ neste equilíbrio de ligação, a reação é reescrita como

$$HHb^+ + O_2 \rightleftharpoons HbO_2 + H^+$$

onde $HHb^+$ é a forma protonada da hemoglobina. Esta equação nos diz que a curva de saturação da hemoglobina pelo $O_2$ é influenciada pela concentração de $H^+$ (**Figura 5-16**). A hemoglobina se liga tanto ao $O_2$ quanto ao $H^+$, mas com afinidade inversa. Quando a concentração do oxigênio é alta, como nos pulmões, a hemoglobina se liga ao $O_2$ e libera prótons. Quando a concentração é baixa, como nos tecidos periféricos, ela se liga ao $H^+$ e o $O_2$ é liberado.

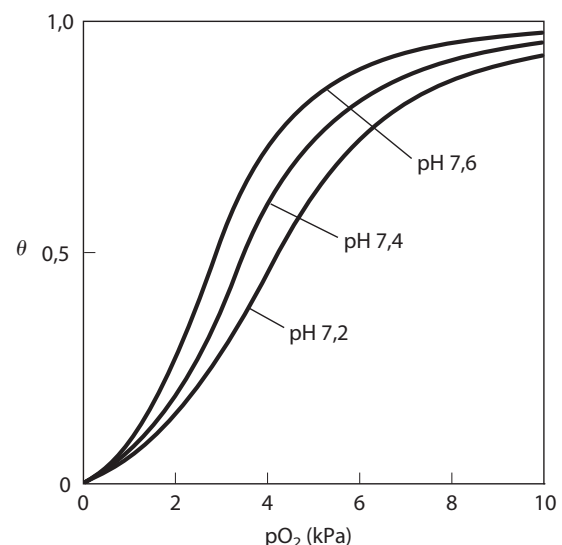
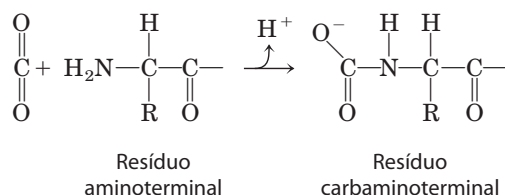



**FIGURA 5-16 Efeito do pH sobre a ligação do oxigênio à hemoglobina.** O pH do sangue é 7,6 nos pulmões e 7,2 nos tecidos. As medidas experimentais das ligações à hemoglobina frequentemente são realizadas a pH 7,4.

O $O_2$ e o $H^+$ não se ligam ao mesmo sítio na hemoglobina. O $O_2$ se liga ao átomo de ferro do heme, enquanto o $H^+$ se liga a qualquer um dos vários resíduos de aminoácidos na proteína. A principal contribuição para o efeito Bohr é feita pela $His^{146}$ (His HC3) das subunidades $\beta$. Esse resíduo, quando protonado, forma um dos pares iônicos – com a $Asp^{94}$ (Asp FG1) – que auxilia na estabilização da desoxiemoglobina no estado T (Figura 5-9). O par iônico estabiliza a forma protonada da His HC3, dando a esse resíduo uma $pK_a$ anormalmente alta no estado T. A $pK_a$ diminui para seu valor normal de 6,0 no estado R porque o par iônico não pode se formar, e esse resíduo está não protonado na oxiemoglobina a pH 7,6, o pH do sangue nos pulmões. À medida que a concentração de $H^+$ aumenta, a protonação da His HC3 promove a liberação do oxigênio por favorecer a transição para o estado T. A protonação dos resíduos aminoterminais das subunidades $\alpha$, de determinados resíduos de His e talvez de outros grupos tem efeito semelhante.

Assim, as quatro cadeias polipeptídicas da hemoglobina se comunicam entre si, não somente com relação à ligação do $O_2$ aos seus grupos heme, mas também com relação à ligação do $H^+$ a resíduos específicos. Além disso, a hemoglobina se liga ao $CO_2$ também de uma maneira inversamente relacionada à ligação do oxigênio. O dióxido de carbono se liga como grupo carbamato ao grupo $\alpha$-amino da extremidade aminoterminal de cada cadeia de globina, formando carbaminoemoglobina:

$$O{=}C{=}O + H_2N{-}CHR{-}C({=}O){-} \longrightarrow {}^{-}O{-}C({=}O){-}NH{-}CHR{-}C({=}O){-} + H^+$$

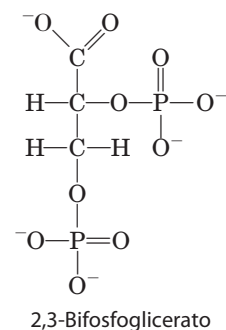
Resíduo aminoterminal — Resíduo carbaminoterminal

Esta reação produz $H^+$, contribuindo para o efeito Bohr. Os carbamatos ligados formam também pontes salinas adicionais (não mostradas na Figura 5-9) que auxiliam na estabilização do estado T e promovem a liberação do oxigênio.

Quando a concentração do dióxido de carbono é alta, como nos tecidos periféricos, algum $CO_2$ se liga à hemoglobina e reduz a afinidade pelo $O_2$, causando sua liberação. Quando, ao contrário, a hemoglobina chega aos pulmões, a alta concentração do oxigênio promove a ligação do $O_2$ e a liberação do $CO_2$. É a capacidade de transmitir informação da interação com o ligante de uma subunidade polipeptídica para as outras que faz a molécula de hemoglobina ser tão maravilhosamente adaptada na integração do transporte de $O_2$, $CO_2$ e $H^+$ pelos eritrócitos.

## A ligação do oxigênio com a hemoglobina é regulada pelo 2,3-bifosfoglicerato

A interação do **2,3-bifosfoglicerato** (**BPG**) com as moléculas de hemoglobina aprimora a função desta, sendo um exemplo de modulação alostérica heterotípica.

$${}^{-}OOC{-}CH(OPO_3^{2-}){-}CH_2{-}OPO_3^{2-}$$

2,3-Bifosfoglicerato

O BPG está presente em concentração relativamente alta nos eritrócitos. Quando a hemoglobina é isolada, ela contém grande quantidade de BPG, difícil de ser removida por completo. Na verdade, as curvas de ligação entre hemoglobina e $O_2$ examinadas até agora foram obtidas na presença de BPG. Sabe-se que o BPG reduz muito a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio – existe uma relação inversa entre a ligação do $O_2$ e do BPG. Por isso, é possível descrever outro processo de ligação para a hemoglobina:

$$HbBPG + O_2 \rightleftharpoons HbO_2 + BPG$$

O BPG liga-se a um sítio distante do sítio de ligação do oxigênio e regula a afinidade do $O_2$ pela hemoglobina em relação à $pO_2$ nos pulmões. O BPG é importante na adaptação fisiológica à $pO_2$ mais baixa nas grandes altitudes. Em um ser humano saudável ao nível do mar, a ligação do $O_2$ à hemoglobina é regulada de modo que a quantidade de $O_2$ liberada nos tecidos se aproxime de 40% da quantidade máxima que o sangue é capaz de transportar (**Figura 5-17**). Imagine que essa pessoa seja transportada repentinamente do nível do mar para uma altitude de 4.500 metros, onde a $pO_2$ é muito mais baixa. A liberação de $O_2$ para os tecidos é reduzida. No entanto, após poucas horas na maior altitude, a concentração de BPG no sangue começa a aumentar, levando a uma redução na afinidade da hemoglobina pelo $O_2$. Esse ajuste no nível de BPG tem somente um pequeno efeito na ligação do $O_2$ nos pulmões, mas seu efeito é considerável na liberação do $O_2$ nos tecidos. Como resultado, a liberação do oxigênio para os tecidos é restaurada para cerca de 40% do $O_2$ que pode ser transportado pelo sangue. A situação é revertida quando a pessoa retorna ao nível do mar. A concentração de BPG nos eritrócitos aumenta também em pessoas que sofrem de **hipoxia**, ou seja, redução da oxigenação dos tecidos periféricos devido ao funcionamento inadequado dos pulmões ou do sistema circulatório.

O sítio de ligação do BPG na hemoglobina é a cavidade entre as subunidades $\beta$ no estado T (**Figura 5-18**). Essa cavidade é revestida por resíduos de aminoácidos com cargas positivas que interagem com os grupos do BPG carregados negativamente. Ao contrário do $O_2$, somente uma molécula de BPG se liga a cada tetrâmero da hemoglobina. O BPG reduz a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio porque estabiliza o estado T. A transição ao estado R estreita o bolsão de ligação para o BPG, impedindo sua ligação. Na ausência do BPG, a hemoglobina é convertida mais facilmente ao estado R.

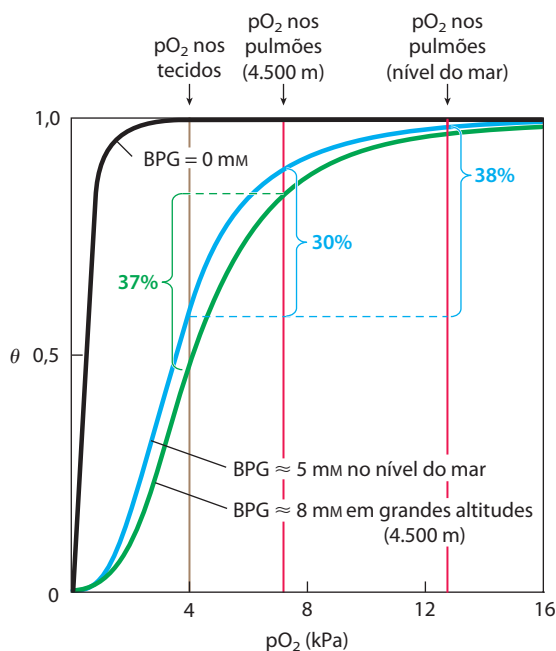



**FIGURA 5-17 Efeito de BPG sobre a ligação do oxigênio à hemoglobina.** A concentração de BPG no sangue humano normal é de 5 mM no nível do mar e 8 mM nas grandes altitudes. Observe que a hemoglobina se liga muito fortemente ao oxigênio na ausência de BPG, e a curva de ligação parece hiperbólica. Na verdade, o coeficiente de Hill medido para a cooperatividade da ligação do $O_2$ se reduz muito pouco (de 3 para cerca de 2,5) quando o BPG é removido da hemoglobina, mas a parte ascendente da curva sigmoide está confinada a uma região muito pequena próxima à origem. No nível do mar, a hemoglobina está quase totalmente saturada com $O_2$ nos pulmões, mas somente um pouco acima de 60% nos tecidos, de forma que a quantidade de $O_2$ liberada nos tecidos alcança cerca de 38% do máximo que pode ser transportado no sangue. Em grandes altitudes, a liberação do $O_2$ é reduzida em um quarto, para 30% do máximo. Um aumento na concentração de BPG, contudo, reduz a afinidade da hemoglobina pelo $O_2$, de forma que aproximadamente 37% do que pode ser transportado é liberado novamente para os tecidos.

**FIGURA 5-18 Ligação do BPG à desoxiemoglobina. (a)** A ligação do BPG estabiliza o estado T da desoxiemoglobina (PDB ID 1B86). As cargas negativas do BPG interagem com vários grupos positivamente carregados (mostrados em azul nesta imagem de contorno de superfície) que circundam o bolsão entre as subunidades $\beta$ no estado T. **(b)** O bolsão para ligação do BPG desaparece com a oxigenação que segue a transição para o estado R (PDB ID 1BBB). (Compare com a Figura 5-10.)

A regulação da ligação do oxigênio à hemoglobina pelo BPG tem importante função no desenvolvimento fetal. Como o feto precisa captar oxigênio do sangue da mãe, a hemoglobina fetal precisa ter maior afinidade pelo $O_2$ do que a hemoglobina materna. O feto sintetiza subunidades $\gamma$ em vez de $\beta$, formando a hemoglobina $\alpha_2\gamma_2$. Esse tetrâmero tem uma afinidade muito mais baixa pelo BPG do que a hemoglobina normal do adulto, tendo uma afinidade mais alta pelo $O_2$. **Proteínas de ligação ao oxigênio – a hemoglobina é suscetível à regulação alostérica**

## A anemia falciforme é uma doença molecular da hemoglobina

A anemia falciforme, doença humana hereditária, demonstra de forma impressionante a importância da sequência de aminoácidos na determinação das estruturas secundária, terciária e quaternária das proteínas globulares e, portanto, suas funções biológicas. Sabe-se que existem quase 500 variantes genéticas da hemoglobina na população humana; a maioria delas é muito rara. A maior parte das variações consiste em diferenças em um único resíduo de aminoácido. Os efeitos sobre a estrutura e a função da hemoglobina com frequência são pequenos, mas às vezes podem ser extraordinários. Cada variação é produto de alteração em um gene. Os genes variantes são denominados alelos. Como os humanos geralmente têm duas cópias de cada gene, um indivíduo pode ter duas cópias de um alelo (sendo, portanto, homozigoto para esse gene) ou uma cópia de cada um de dois alelos diferentes (portanto, heterozigoto).

A anemia falciforme ocorre em indivíduos que herdaram o alelo para a hemoglobina falciforme de ambos os pais. Os eritrócitos desses indivíduos são anormais e em menor número. O sangue contém muitos eritrócitos longos e finos em forma de foice, além de um grande número de células imaturas (**Figura 5-19**). Quando a hemoglobina das células falciformes (chamada de hemoglobina S) é desoxigenada, ela torna-se insolúvel e forma polímeros que se agregam em fibras tubulares (**Figura 5-20**). A hemoglobina normal (hemoglobina A) permanece solúvel após a desoxigenação. As fibras insolúveis induzem a deformação dos eritrócitos, e a proporção das células falciformes aumenta muito à medida que o sangue é desoxigenado.

As propriedades alteradas da hemoglobina S resultam da substituição de um único aminoácido, Val em vez de

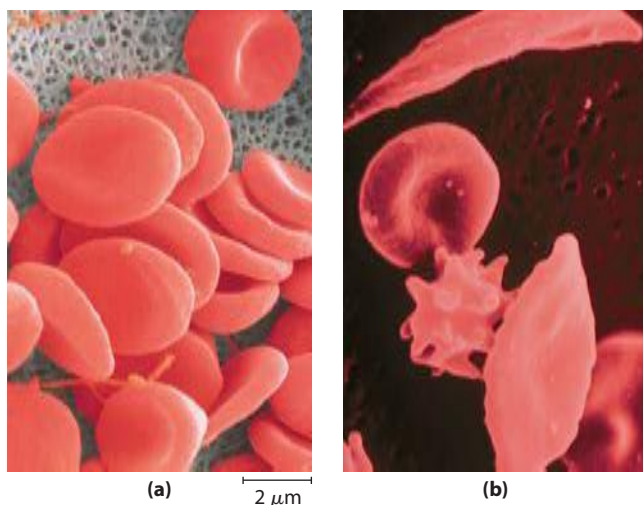



**FIGURA 5-19** Comparação entre **(a)** eritrócitos normais, uniformes e em forma de taça e **(b)** eritrócitos com formas variadas vistos na anemia falciforme, que variam desde os normais até os pontudos ou em forma de foice.

Glu na posição 6 das duas cadeias $\beta$. O grupo R da valina não tem carga, ao passo que o glutamato tem carga negativa em pH 7,4. Por isso, a hemoglobina S tem duas cargas negativas a menos do que a hemoglobina A (uma a menos em cada cadeia $\beta$). A substituição do resíduo Glu pelo Val cria um ponto de contato hidrofóbico "adesivo" na posição 6 da cadeia $\beta$, que está na superfície externa da molécula. Devido a esses pontos, as moléculas de desoxiemoglobina S se associam anormalmente entre si, formando os agregados longos e fibrosos característicos dessa enfermidade.

**Proteínas de ligação ao oxigênio – defeitos na hemoglobina causam doença genética séria**

A anemia falciforme, como observado, ocorre em indivíduos homozigotos para o alelo falciforme do gene que codifica a subunidade $\beta$ da hemoglobina. Os indivíduos que recebem o alelo falciforme apenas de um dos pais (sendo, portanto, heterozigotos) apresentam uma condição mais branda chamada de traço falciforme; somente cerca de 1% de seus eritrócitos torna-se falciforme com a desoxigenação. Esses indivíduos podem ter vida totalmente normal se evitarem exercícios vigorosos ou outros estresses do sistema circulatório.

A anemia falciforme é dolorosa e fatal. As pessoas com essa doença sofrem crises repetidas provocadas por esforço físico. Tornam-se fracas, com vertigens e ofegantes, sentem ruídos cardíacos e aumento na pulsação. O conteúdo de hemoglobina do seu sangue é somente a metade do valor normal de 15 a 16 g/100 mL, porque as células falciformes são muito frágeis e se rompem com facilidade; isso resulta em anemia ("falta de sangue"). Uma consequência ainda mais grave é que os capilares ficam bloqueados pelas células longas e com morfologia anormal, causando muita dor e interferindo com a função normal dos capilares – principal fator para a morte prematura de muitos pacientes.

Sem tratamento médico, as pessoas com anemia falciforme geralmente morrem na infância. Curiosamente, a frequência do alelo falciforme na população é muito alta em determinadas partes da África. A investigação desse assunto levou à constatação de que, nos indivíduos heterozigotos, o alelo confere resistência pequena, mas significativa, a formas letais da malária. A seleção natural resultou em uma população de alelos que equilibra os efeitos deletérios da condição homozigota com a resistência à malária propiciada pela condição heterozigota. ■

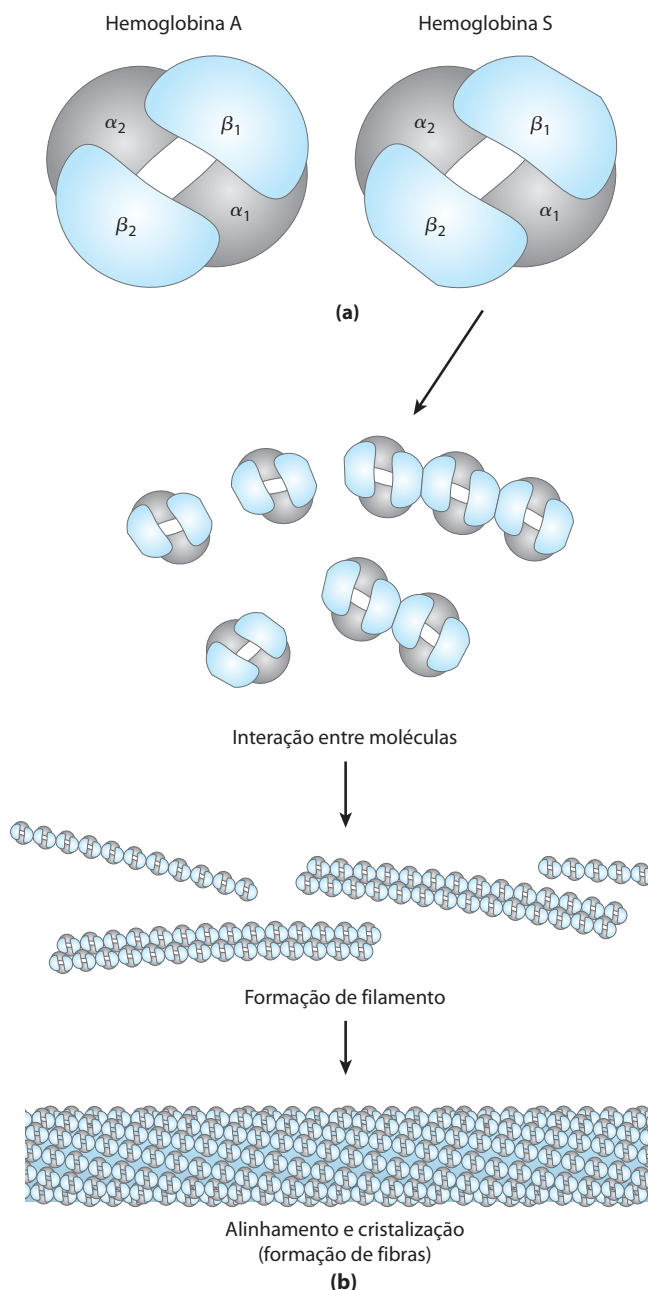



**FIGURA 5-20** **Hemoglobina normal e falciforme.** **(a)** As diferenças sutis entre a conformação da hemoglobina A e da hemoglobina S resultam da mudança de um único aminoácido nas cadeias $\beta$. **(b)** Como resultado desta mudança, a desoxiemoglobina S tem uma porção hidrofóbica na sua superfície, o que causa a agregação das moléculas em filamentos que se associam em fibras insolúveis.

**RESUMO 5.1** Interação reversível de uma proteína com um ligante: proteínas de ligação ao oxigênio

- A função proteica frequentemente necessita de interações com outras moléculas. Uma proteína interage com uma molécula, conhecida como ligante, no seu sítio de ligação. As proteínas sofrem alterações conformacionais quando interagem com o ligante, processo chamado de encaixe induzido. Em uma proteína multimérica, a interação do ligante com uma subunidade pode afetar a interação com as outras subunidades. A interação com o ligante pode ser regulada.
- A mioglobina contém um grupo prostético heme, que se liga ao oxigênio. O heme consiste em um único átomo de $Fe^{2+}$ coordenado no interior de uma porfirina. O oxigênio se liga reversivelmente à mioglobina; essa ligação reversível simples pode ser descrita por uma constante de associação $K_a$ ou uma constante de dissociação $K_d$. Para uma proteína monomérica como a mioglobina, a fração dos sítios de ligação ocupados pelo ligante é uma função hiperbólica da concentração do ligante.
- A hemoglobina adulta normal tem quatro subunidades contendo heme, duas $\alpha$ e duas $\beta$, semelhantes em estrutura entre si e com a mioglobina. A hemoglobina existe em dois estados estruturais alternados, T e R. O estado T é mais estável quando o oxigênio não está ligado. A ligação do oxigênio promove a transição para o estado R.
- A ligação do oxigênio à hemoglobina é alostérica e cooperativa. Quando o $O_2$ ocupa um sítio de ligação, a hemoglobina sofre mudanças conformacionais que afetam os outros sítios de ligação – exemplo de comportamento alostérico. As mudanças conformacionais entre os estados T e R, mediadas pelas interações subunidade-subunidade, resultam em ligação cooperativa; isto é representado por uma curva de ligação sigmoide e pode ser analisado por uma curva de Hill.
- Dois modelos principais têm sido propostos para explicar a interação cooperativa de ligantes com proteínas multiméricas: o modelo combinado e o modelo sequencial.
- A hemoglobina também se liga ao $H^+$ e ao $CO_2$, resultando na formação de pares iônicos que estabilizam o estado T e reduzem a afinidade da proteína pelo $O_2$ (o efeito Bohr). A ligação do $O_2$ à hemoglobina é modulada também pelo 2,3-bifosfoglicerato, que se liga ao estado T e o estabiliza.
- A anemia falciforme é uma doença genética causada pela substituição de um único aminoácido ($Glu^6$ por $Val^6$) nas cadeias $\beta$ da hemoglobina. A mudança gera uma região hidrofóbica na superfície da hemoglobina que causa a agregação das moléculas em feixes de fibras. Essa condição homozigota resulta em graves complicações médicas.

## 5.2 Interações complementares entre proteínas e ligantes: o sistema imune e as imunoglobulinas

Foi visto como as conformações das proteínas de ligação ao oxigênio afetam e são afetadas pela interação de ligantes pequenos ($O_2$ ou CO) com o grupo heme. No entanto, a maioria das interações proteína-ligante não envolve um grupo prostético. Em vez disso, o sítio de ligação com o ligante mais comumente se parece ao sítio de ligação da hemoglobina com o BPG – uma fenda na proteína revestida por resíduos de aminoácidos, organizados para tornar a interação altamente específica. A diferenciação eficaz entre os ligantes é a norma nos sítios de ligação, mesmo quando os ligantes apresentam apenas pequenas diferenças estruturais.

Todos os vertebrados têm um sistema imune capaz de fazer a distinção molecular entre "próprio" e "não próprio" e destruir o que for identificado como não próprio. Dessa forma, o sistema imune elimina vírus, bactérias e outros patógenos e moléculas que possam representar ameaça ao organismo. Em nível fisiológico, a resposta imune constitui um conjunto intricado e coordenado de interações entre muitas classes de proteínas, moléculas e tipos celulares. No nível das proteínas individuais, a resposta imune demonstra como um sistema bioquímico altamente sensível é desenvolvido a partir de interações reversíveis entre ligantes e proteínas.

### A resposta imune caracteriza um conjunto de células e proteínas especializadas

A imunidade é realizada por uma grande variedade de **leucócitos** (células brancas do sangue), incluindo os **macrófagos** e os **linfócitos**, todos desenvolvidos na medula óssea a partir de células-tronco não diferenciadas. Os linfócitos deixam a corrente sanguínea e patrulham os tecidos, cada célula produzindo uma ou mais proteínas capazes de reconhecer e de se ligar a moléculas que poderiam sinalizar uma infecção.

A resposta imune consiste em dois sistemas complementares, o sistema imune humoral e o celular. O **sistema imune humoral** (do latim *humor,* "fluido") é dirigido para infecções bacterianas e vírus extracelulares (encontrados nos fluidos do corpo), mas também pode responder a proteínas estranhas. O **sistema imune celular** destrói células hospedeiras infectadas por vírus, além de destruir alguns parasitas e tecidos estranhos.

No centro da resposta imune humoral estão proteínas solúveis chamadas de **anticorpos** ou **imunoglobulinas**, abreviadas como **Ig**. As imunoglobulinas se ligam a bactérias, vírus ou moléculas grandes identificadas como estranhas e as conduzem para a destruição. Constituindo 20% do total de proteínas sanguíneas, as imunoglobulinas são produzidas pelos **linfócitos B**, ou **células B**, que completam seu desenvolvimento na medula óssea.

Os agentes no centro da resposta imune celular são uma classe de **linfócitos T**, ou **células T** (assim chamadas porque os últimos estágios de seu desenvolvimento ocorrem no timo), conhecidas como **células T citotóxicas** (**células $T_C$**). O reconhecimento de células infectadas ou de parasitas envolve proteínas chamadas de **receptores de células T** na superfície das células T citotóxicas. Os receptores são proteínas normalmente encontradas na superfície externa das células e que se estendem através da membrana plasmática; eles reconhecem e interagem com ligantes extracelulares, desencadeando mudanças no interior da célula.

Além das células T citotóxicas, existem as **células T auxiliares** (**células $T_H$,** de *helper T cells*), cuja função é produzir proteínas sinalizadoras solúveis chamadas de citocinas, as quais incluem as interleucinas. As células $T_H$ interagem com os macrófagos e participam somente de modo indireto na destruição das células infectadas e dos patógenos, estimulando a proliferação seletiva das células $T_C$ e B que podem se ligar a um antígeno específico. Esse processo, chamado de **seleção clonal**, aumenta o número de células do sistema imune que podem responder a um patógeno específico. A importância das células $T_H$ é ilustrada pela epidemia produzida pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana), o vírus que causa a Aids (síndrome da imunodeficiência adquirida). Os alvos primários da infecção por HIV são as células $T_H$, cuja eliminação incapacita progressivamente todo o sistema imune. A Tabela 5-2 resume as funções de alguns leucócitos do sistema imune.

Cada proteína de reconhecimento do sistema imune, seja um receptor de célula T ou um anticorpo produzido pelas células B, se liga especificamente a uma determinada estrutura química, distinguindo-a de todas as outras. Os humanos têm a capacidade de produzir mais de $10^8$ anticorpos diferentes com diferentes especificidades de ligação. Em decorrência dessa extraordinária diversidade, qualquer estrutura química na superfície de um vírus ou de uma célula invasora terá a probabilidade de ser reconhecida por um ou mais anticorpos e interagir com eles. A diversidade de anticorpos é derivada do rearranjo aleatório de um conjunto de segmentos de genes de imunoglobulina por meio dos mecanismos de recombinação gênica apresentados no Capítulo 25 (ver Figura 25-42).

Um vocabulário especializado é usado para descrever as interações exclusivas entre os anticorpos ou receptores de células T e as moléculas com as quais se ligam. Qualquer molécula ou patógeno capaz de induzir resposta imune chama-se **antígeno**. Um antígeno pode ser um vírus, uma parede bacteriana, uma proteína isolada ou outra macromolécula. Um antígeno complexo pode interagir com vários anticorpos diferentes. Um determinado anticorpo ou um receptor de célula T se liga somente a uma estrutura molecular específica dentro do antígeno chamada de **determinante antigênico** ou **epítopo**.

**TABELA 5-2** Alguns tipos de leucócitos associados com o sistema imune

| Tipo celular | Função |
|---|---|
| **Macrófagos** | Ingerem, por fagocitose, células e partículas grandes |
| **Linfócitos B** (células B) | Produzem e secretam anticorpos |
| **Linfócitos T** (células T) | |
| Células T citotóxicas ($T_C$) | Interagem com células hospedeiras infectadas por meio de receptores na superfície das células T |
| Células T auxiliares ($T_H$) | Interagem com macrófagos e secretam citocinas (interleucinas) que estimulam a proliferação das células $T_C$, $T_H$ e B |

Seria improdutivo para o sistema imune responder a pequenas moléculas, intermediários comuns e produtos do metabolismo celular. Moléculas com massa molecular menor que 5.000 em geral não são reconhecidas como antígenos. No entanto, quando as moléculas pequenas são unidas covalentemente a uma proteína grande, no laboratório, elas podem ser usadas para induzir uma resposta imune. Essas moléculas pequenas são chamadas de **haptenos**. Os anticorpos produzidos em resposta aos haptenos ligados a proteínas se ligarão às mesmas moléculas pequenas na sua forma livre. Tais anticorpos são utilizados às vezes no desenvolvimento de testes analíticos, descritos adiante neste capítulo, ou como ligante específico na cromatografia de afinidade (ver Figura 3-18c). Agora será feita uma descrição mais detalhada dos anticorpos e de suas propriedades de ligação.

## Os anticorpos têm dois sítios idênticos de ligação ao antígeno

A **imunoglobulina G (IgG)** é a principal classe de molécula de anticorpo e é uma das proteínas mais abundantes no soro. As IgG são formadas por quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias pesadas (grandes) e duas cadeias leves, unidas por ligações não covalentes e ligações dissulfeto, formando um complexo com massa molecular de 150.000. As cadeias pesadas interagem em uma das extremidades e se ramificam para interagir separadamente com as cadeias leves, formando uma molécula com o formato de Y (**Figura 5-21**). As imunoglobulinas podem ser hidrolisadas por proteases nas "dobradiças" que separam a base da molécula de seus braços. A hidrólise pela papaína libera o fragmento basal, chamado de **Fc** porque geralmente *c*ristaliza com facilidade, e os dois ramos, chamados de **Fab** (do inglês *antigen-binding*), ou seja, os fragmentos de ligação ao antígeno. Cada ramo tem um único sítio de ligação ao antígeno.

A estrutura básica das imunoglobulinas foi estabelecida por Gerald Edelman e Rodney Porter. Cada cadeia é formada por domínios identificáveis; alguns são constantes em sequência e estrutura entre as IgG, outros são variáveis. Os domínios constantes têm uma estrutura característica conhecida como **padrão de enovelamento das imunoglobulinas**, motivo estrutural bem conservado em todas as proteínas da classe $\beta$ (Capítulo 4). Existem três domínios constantes em cada cadeia pesada e um em cada cadeia leve. As cadeias leves e pesadas também têm, cada uma delas, um domínio variável, no qual se encontra a maior parte da variabilidade na sequência de aminoácidos. Os domínios variáveis se associam para formar o sítio de ligação ao antígeno (Figura 5-21), permitindo a formação de um complexo antígeno-anticorpo (**Figura 5-22**).

Em muitos vertebrados, a IgG é apenas uma das cinco classes de imunoglobulinas. Cada classe tem um tipo característico de cadeia pesada, denominados $\alpha$, $\delta$, $\varepsilon$, $\gamma$ e $\mu$ para IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. Dois tipos de cadeia leve, $\kappa$ e $\lambda$, ocorrem em todas as classes de imunoglobulinas. A estrutura global da **IgD** e da **IgE** é semelhante à da IgG. A **IgM** ocorre tanto como monômero, a forma de ligação à membrana, quanto como forma secretada que consiste em um pentâmero da sua

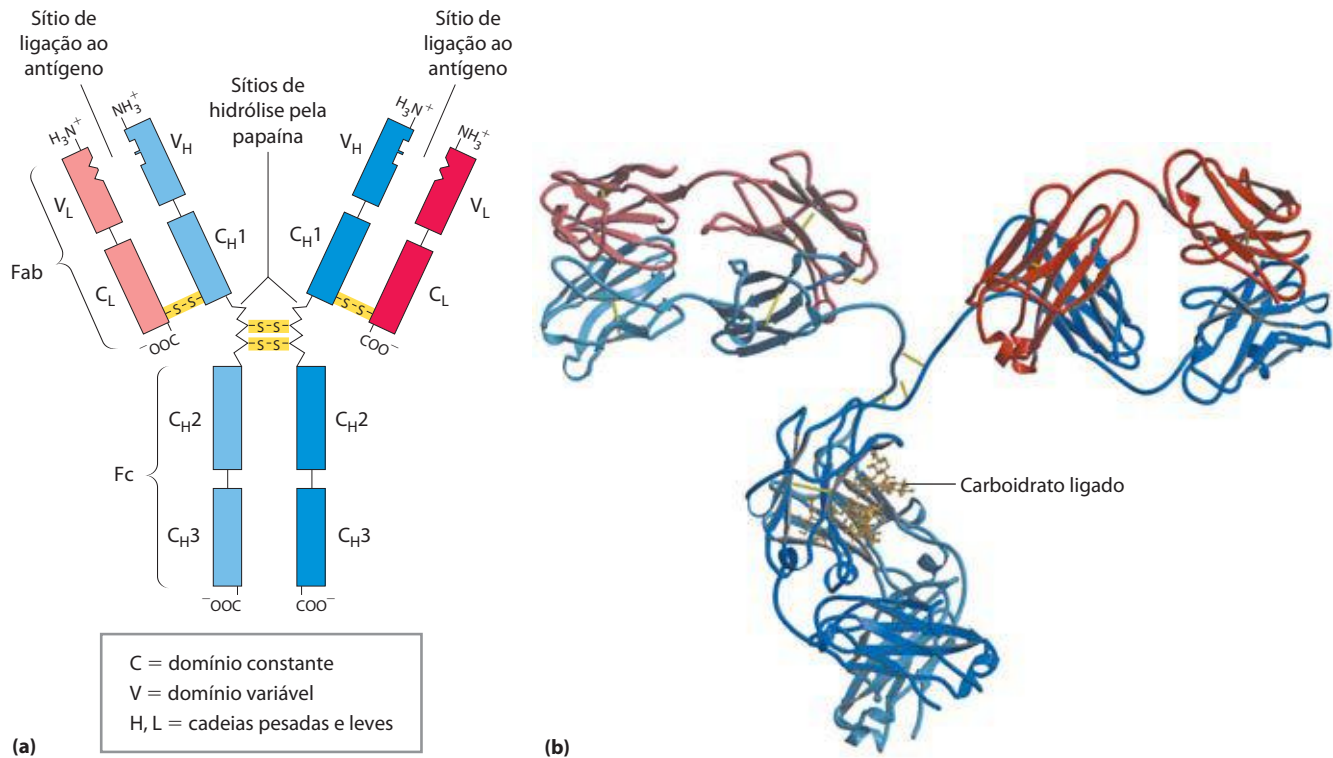



**FIGURA 5-21 Imunoglobulina G.** **(a)** Pares de cadeias leves e pesadas combinam-se para formar uma molécula com formato de Y. Dois sítios de ligação ao antígeno formam-se pela combinação dos domínios variáveis de uma cadeia leve ($V_L$) e de uma cadeia pesada ($V_H$). A hidrólise com papaína separa as porções Fc e Fab da proteína na região da dobradiça. A porção Fc também contém carboidratos ligados (mostrados em [b]). **(b)** Modelo em fita da primeira molécula completa de IgG cristalizada e analisada estruturalmente (PDB ID 1IGT). Apesar de a molécula ter duas cadeias pesadas idênticas (dois tons de azul) e duas cadeias leves idênticas (dois tons de vermelho), ela cristaliza na conformação assimétrica mostrada aqui. É possível que a flexibilidade conformacional seja importante para a função das imunoglobulinas.

estrutura básica (**Figura 5-23**). A **IgA**, encontrada principalmente em secreções como saliva, lágrima e leite, pode ser um monômero, dímero ou trímero. A IgM é o primeiro anticorpo sintetizado pelos linfócitos B e o principal anticorpo nos estágios iniciais de uma resposta imune primária. Algumas células B logo começam a produzir IgD (com o mesmo sítio de ligação ao antígeno que a IgM produzida pela mesma célula), mas sua função específica é menos clara.

A IgG descrita anteriormente é o principal anticorpo secundário na resposta imune que se inicia por uma classe de células B chamadas de células B de memória. Como parte do avanço da imunidade do organismo aos antígenos já encontrados e combatidos, a IgG é a imunoglobulina mais

Antígeno

Anticorpo

Complexo antígeno-anticorpo

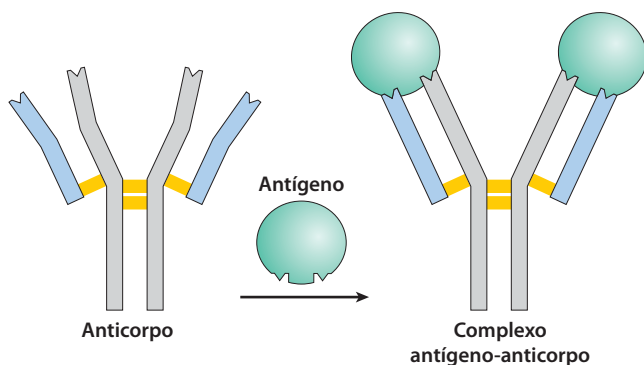



**FIGURA 5-22 Ligação da IgG a um antígeno.** Os sítios de ligação na IgG frequentemente sofrem pequenas mudanças conformacionais para gerar um encaixe ótimo para o antígeno. Este encaixe induzido é comum em muitas interações proteína-ligante.

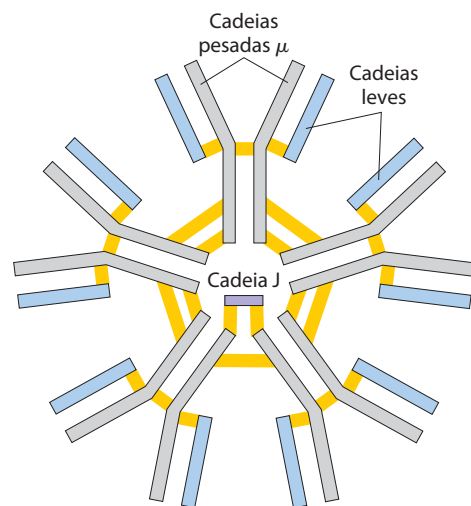



**FIGURA 5-23 Pentâmero IgM de unidades de imunoglobulina.** O pentâmero é unido por ligações dissulfeto (em amarelo). A cadeia J é um polipeptídeo de $M_r$ 20.000, encontrado na IgA e na IgM.

abundante no sangue. Quando a IgG se liga a uma bactéria invasora ou a um vírus, ela ativa determinados leucócitos como os macrófagos para engolfar e destruir o invasor e também ativa alguns outros elementos da resposta imune. Os receptores na superfície dos macrófagos reconhecem e se ligam à região Fc da IgG. Quando esses receptores se ligam a um complexo patógeno-anticorpo, o macrófago engolfa, por fagocitose, o complexo (**Figura 5-24**).

A IgE tem um papel importante na resposta alérgica, interagindo com basófilos (leucócitos fagocíticos) no sangue e com células secretoras de histamina chamadas de mastócitos, altamente distribuídas nos tecidos. Essa imunoglobulina se liga, por meio de sua região Fc, a receptores especiais nos basófilos ou nos mastócitos. Assim, a IgE serve como receptor para o antígeno. Se o antígeno estiver ligado, as células são induzidas a secretar histamina e outras aminas com atividades biológicas que causam dilatação e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos. Acredita-se que esses efeitos sobre os vasos facilitem o movimento das células e proteínas do sistema imune para o local da inflamação. Também produzem os sintomas normalmente associados com alergias. O pólen ou outros alérgenos são reconhecidos como estranhos, desencadeando uma resposta imune normalmente reservada para patógenos. ■

**FIGURA 5-24 Fagocitose por um macrófago de um vírus ligado a anticorpos.** A região Fc dos anticorpos ligados ao vírus se liga aos receptores Fc na superfície de um macrófago, desencadeando o engolfamento e a destruição do vírus.

## Os anticorpos se ligam ao antígeno de modo firme e específico

A especificidade de ligação de um anticorpo é determinada pelos resíduos de aminoácidos nos domínios variáveis de suas cadeias leves e pesadas. Muitos resíduos desses domínios são variáveis, de uma forma aleatória. Alguns, chamados de hipervariáveis, são bem mais suscetíveis à variação – em especial os que revestem o sítio de ligação ao antígeno. A especificidade é conferida pela complementaridade química entre o antígeno e o seu sítio específico de ligação, em termos de forma e da localização dos grupos carregados, apolares e com ligações de hidrogênio. Por exemplo, um sítio de ligação com um grupo de carga negativa pode se ligar a um antígeno com carga positiva na posição complementar. Em muitos exemplos, a complementaridade é obtida de modo interativo, uma vez que as estruturas do antígeno e do sítio de ligação são influenciadas mutuamente à medida que se aproximam. As mudanças conformacionais no anticorpo e/ou no antígeno, então, permitem a interação completa entre os grupos complementares. Esse é um exemplo de encaixe induzido. O complexo formado por um peptídeo derivado do HIV (modelo de antígeno) e uma molécula Fab, mostrado na **Figura 5-25**, ilustra algumas dessas propriedades. As mudanças na estrutura observadas após a ligação do antígeno são particularmente notáveis neste exemplo.

Uma interação antígeno-anticorpo típica é muito forte, caracterizada por valores de $K_d$ tão baixos quanto $10^{-10}$ M (lembre-se de que uma $K_d$ mais baixa corresponde a uma interação mais forte; ver Tabela 5-1). A $K_d$ reflete a energia derivada das várias interações de van der Waals, iônicas, hidrofóbicas e de ligações de hidrogênio que estabilizam a ligação. A energia de ligação necessária para produzir uma $K_d$ de $10^{-10}$ M é de cerca de 65 kJ/mol.

**(a)** Conformação sem antígeno ligado

**(b)** Antígeno ligado (mas não mostrado)

**(c)** Antígeno ligado (mostrado)

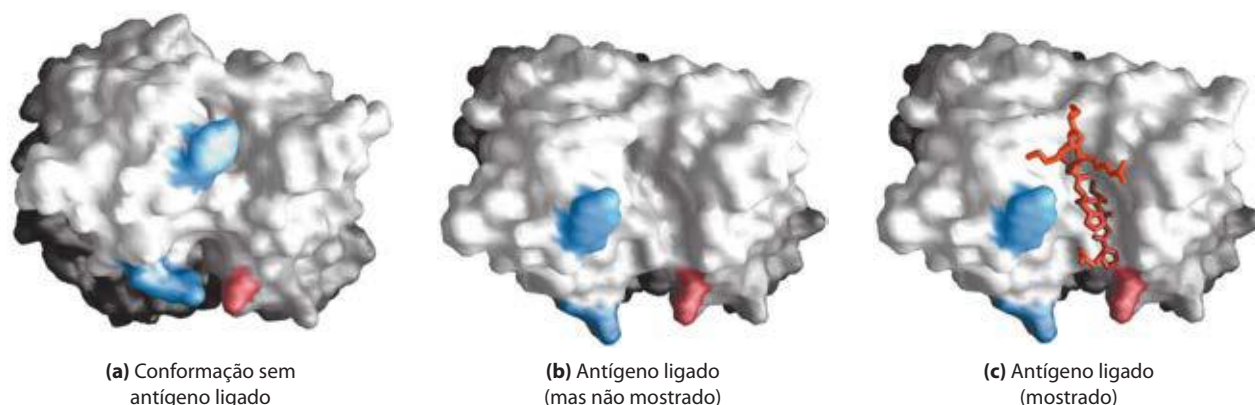



**FIGURA 5-25 Encaixe induzido na ligação de um antígeno à IgG.** A molécula, mostrada em contorno de superfície, é o fragmento Fab de uma IgG. O antígeno é um pequeno peptídeo derivado do HIV. Dois resíduos na cadeia pesada (em azul) e um na cadeia leve (em vermelho) estão coloridos para servirem de pontos de referência visual. **(a)** Visão, na direção do sítio de ligação ao antígeno, do fragmento Fab na ausência do antígeno (PDB ID 1GGC). **(b)** A mesma visão, mas com o fragmento Fab na conformação "ligada" (PDB ID 1GGI); o antígeno foi omitido para dar uma visão clara do sítio de ligação alterado. Observe como a cavidade de ligação se alargou e vários grupos tiveram suas posições alteradas. **(c)** A mesma visão de (b), mas com o antígeno no sítio de ligação, desenhado como estrutura em bastão vermelho.

## A interação antígeno-anticorpo é a base para uma grande variedade de procedimentos analíticos importantes

A extraordinária afinidade de ligação e a especificidade dos anticorpos os tornam reagentes analíticos valiosos. Dois tipos de preparação de anticorpos são utilizados: policlonal e monoclonal. Os **anticorpos policlonais** são aqueles produzidos por muitos linfócitos B diferentes em resposta a um antígeno, como uma proteína injetada em um animal. As células na população de linfócitos B produzem anticorpos que se ligam a epítopos diferentes e específicos no antígeno. Assim, as preparações policlonais contêm uma mistura de anticorpos que reconhecem diferentes partes da proteína. Os **anticorpos monoclonais**, em contrapartida, são sintetizados por uma população de células B idênticas (um **clone**) em cultivo celular. Esses anticorpos são homogêneos, todos reconhecendo o mesmo epítopo. A técnica para produção de anticorpos monoclonais foi desenvolvida por Georges Köhler e Cesar Milstein.

Georges Köhler, 1946-1995

Cesar Milstein, 1927-2002

A especificidade dos anticorpos tem utilidades práticas. Um determinado anticorpo pode ser ligado covalentemente a uma resina e usado em uma coluna cromatográfica como a mostrada na Figura 3-17c. Quando uma mistura de proteínas é adicionada à coluna, o anticorpo se liga especificamente à sua proteína-alvo e a retém na coluna enquanto as outras proteínas não são retidas. A proteína-alvo é então eluída da resina por uma solução salina ou algum outro agente. Essa é uma ferramenta potente na análise de proteínas.

Em outra técnica analítica versátil, um anticorpo é ligado a um marcador radioativo ou algum outro reagente que o torna facilmente detectável. Quando o anticorpo se liga à proteína-alvo, o marcador revela a presença da proteína em uma solução ou a sua localização em um gel, ou mesmo em uma célula viva. Diversas variações desse procedimento estão ilustradas na **Figura 5-26**.

(a)

Elisa

(b)

(c)

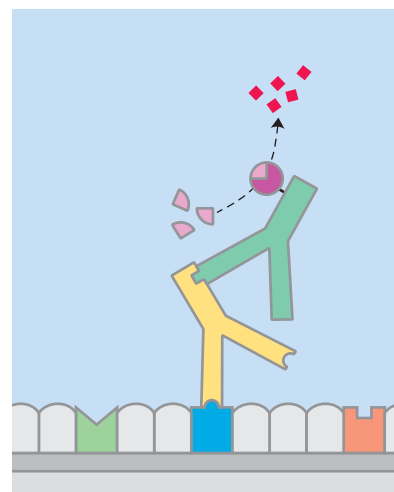
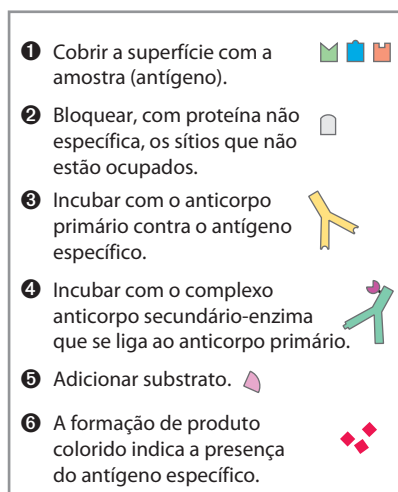
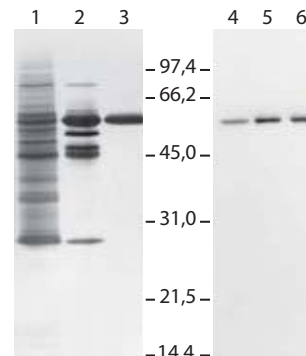



**FIGURA 5-26 Técnicas com anticorpo.** A reação específica de um anticorpo com o seu antígeno é a base de várias técnicas que identificam e quantificam uma proteína específica em uma amostra complexa. **(a)** Uma representação esquemática do método geral. **(b)** Um Elisa para testar a presença de anticorpos anti-HSV (vírus do herpes simples) em amostras de sangue. Os poços foram recobertos com o antígeno HSV, ao qual se ligarão os anticorpos contra HSV. O segundo anticorpo é uma anti-IgG humana ligada à peroxidase. Ao se completarem as etapas mostradas em (a), os poços com coloração amarelo-brilhante são os que conterão as amostras de sangue com as maiores quantidades de anticorpos anti-HSV. **(c)** Um *imunoblot*. As canaletas 1 a 3 são de um gel de SDS; amostras de estágios sucessivos na purificação de uma proteína-cinase foram separadas e coradas com azul de Coomassie. As canaletas 4 a 6 mostram as mesmas amostras, mas que foram eletroforeticamente transferidas para uma membrana de nitrocelulose após a separação no gel de SDS. A membrana foi então "sondada" com anticorpo contra a proteína-cinase. Os números entre o gel e o *imunoblot* indicam a massa molecular, $M_r$, em milhares.

Um **Elisa** (do inglês ***e**nzyme-**l**inked **i**mmuno**s**orbent **a**ssay*, ou ensaio imunossorvente ligado a enzima) pode ser usado para fazer uma triagem rápida da quantidade de um antígeno em uma amostra (Figura 5-26b). As proteínas da amostra são adsorvidas em uma superfície inerte, geralmente uma placa de poliestireno com 96 poços. A superfície é lavada com uma solução de uma proteína não específica de baixo custo (em geral, caseína de leite em pó sem gordura) para bloquear a adsorção das proteínas introduzidas nas etapas subsequentes aos locais vazios da placa. A superfície é então tratada com solução contendo o anticorpo primário – um anticorpo contra a proteína de interesse. Anticorpos não ligados são removidos por lavagem, e a superfície é tratada com uma solução contendo um anticorpo secundário – contra o anticorpo primário – ligado a uma enzima que catalisa uma reação que forma um produto colorido. Após a remoção do anticorpo secundário não ligado, é adicionado o substrato da enzima. A formação do produto (monitorada pela intensidade da cor) é proporcional à concentração, na amostra, da proteína de interesse.

Em um **ensaio de *imunoblot*,** também chamado de ***Western blot*** (Figura 5-26c), as proteínas separadas por eletroforese em gel são transferidas eletroforeticamente para uma membrana de nitrocelulose. A membrana é bloqueada (conforme descrito antes para o Elisa) e tratada sucessivamente com o anticorpo primário, com o anticorpo secundário ligado à enzima e com o substrato. Um precipitado colorido se forma somente na banda que contém a proteína de interesse. O *imunoblot* permite a detecção de um componente minoritário em uma amostra e fornece uma estimativa de sua massa molecular. ***Imunoblot***

Outras facetas dos anticorpos serão abordadas em capítulos posteriores. Extremamente importantes em medicina, os anticorpos podem esclarecer muito sobre a estrutura das proteínas e a ação dos genes.

### RESUMO 5.2 Interações complementares entre proteínas e ligantes: o sistema imune e as imunoglobulinas

- A resposta imune é mediada por interações entre um grupo de leucócitos especializados e suas proteínas associadas. Os linfócitos T produzem receptores de células T, e os linfócitos B produzem imunoglobulinas. Em um processo chamado de seleção clonal, as células T auxiliares induzem a proliferação ou de células B e células T citotóxicas, que produzem imunoglobulinas, ou de receptores de células T, que interagem com um antígeno específico.
- Os humanos têm cinco classes de imunoglobulinas, cada uma com funções biológicas distintas. A IgG é a classe mais abundante, sendo uma proteína em formato de Y com duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. Os domínios próximos da extremidade superior do Y são hipervariáveis dentro da vasta população das IgG e formam dois sítios de ligação ao antígeno.
- Determinada imunoglobulina geralmente interage com uma parte somente, chamada de epítopo, de um antígeno grande. A interação frequentemente envolve mudanças na conformação da IgG, um encaixe induzido ao antígeno.
- A especificidade de ligação refinada das imunoglobulinas é explorada em técnicas analíticas como Elisa e *imunoblot*.

## 5.3 Interações proteicas moduladas por energia química: actina, miosina e motores moleculares

Os organismos se movem. As células se movem. As organelas e as macromoléculas se movem dentro das células. A maioria desses movimentos resulta da atividade de uma classe fascinante de motores moleculares proteicos. Abastecidos com energia química, geralmente derivada de ATP, grandes agregados de proteínas motoras são submetidos a mudanças conformacionais cíclicas que se acumulam em uma força unificada e direcional – força muito pequena que separa os cromossomos em uma célula em divisão, e uma força imensa que impulsiona no ar um felino selvagem de um quarto de tonelada.

As interações entre as proteínas motoras, como pode ser previsto, caracterizam combinações complementares de interações de van der Waals, iônicas, hidrofóbicas e de ligações de hidrogênio nos sítios de ligação das proteínas. Nas proteínas motoras, no entanto, essas interações alcançam níveis extremamente altos de organização espacial e temporal.

As proteínas motoras constituem a base da contração muscular, da migração das organelas ao longo dos microtúbulos, da rotação dos flagelos bacterianos e do movimento de algumas proteínas ao longo do DNA. As proteínas chamadas de cinesinas e dineínas movem-se ao longo dos microtúbulos, puxando organelas ou reorganizando os cromossomos durante a divisão celular. Uma interação da dineína com os microtúbulos realiza o movimento dos cílios e dos flagelos eucarióticos. O movimento flagelar das bactérias envolve um motor rotacional complexo na base do flagelo (ver Figura 19-41). As helicases, as polimerases e outras proteínas movem-se ao longo do DNA ao realizarem suas funções no metabolismo do ácido nucleico (Capítulo 25). Aqui o foco será o exemplo bem estudado das proteínas contráteis do músculo esquelético dos vertebrados, como um paradigma para a forma pela qual as proteínas transformam energia química em movimento.

### A actina e a miosina são as principais proteínas do músculo

A força contrátil do músculo é gerada pela interação de duas proteínas, miosina e actina. Organizadas em filamentos submetidos a interações transitórias que deslizam uns sobre os outros para realizar a contração, juntas, a actina e a miosina compõem mais de 80% da massa proteica do músculo.

A **miosina** ($M_r$ 520.000) tem seis subunidades: duas cadeias pesadas (cada qual com $M_r$ 220.000) e quatro cadeias leves (cada qual com $M_r$ 20.000). As cadeias pesadas respondem pela maior parte da estrutura total. Nas extremidades C-terminais, estão organizadas como hélices $\alpha$ estendidas, enroladas umas ao redor das outras em uma espiral fibrosa enrolada para a esquerda, semelhante à da $\alpha$-queratina (**Figura 5-27a**). Cada cadeia pesada tem,

nas extremidades N-terminais, um domínio globular grande contendo o sítio onde o ATP é hidrolisado. As cadeias leves estão associadas com o domínio globular. Quando a miosina é tratada com a protease tripsina por um período curto, a maioria das fibras é hidrolisada, dividindo a proteína em componentes chamados de meromiosina leve e pesada (Figura 5-27b). O domínio globular – chamado de subfragmento 1 da miosina, ou S1, ou simplesmente cabeça de miosina – é liberado da meromiosina pesada por hidrólise com papaína. O fragmento S1, o domínio motor que torna possível a contração muscular, pode ser cristalizado, e sua estrutura completa, conforme determinada por Ivan Rayment e Hazel Holden, está mostrada na Figura 5-27c.

Nas células musculares, as moléculas de miosina se agregam e formam estruturas chamadas de **filamentos grossos** (**Figura 5-28a**). Essas estruturas em forma de

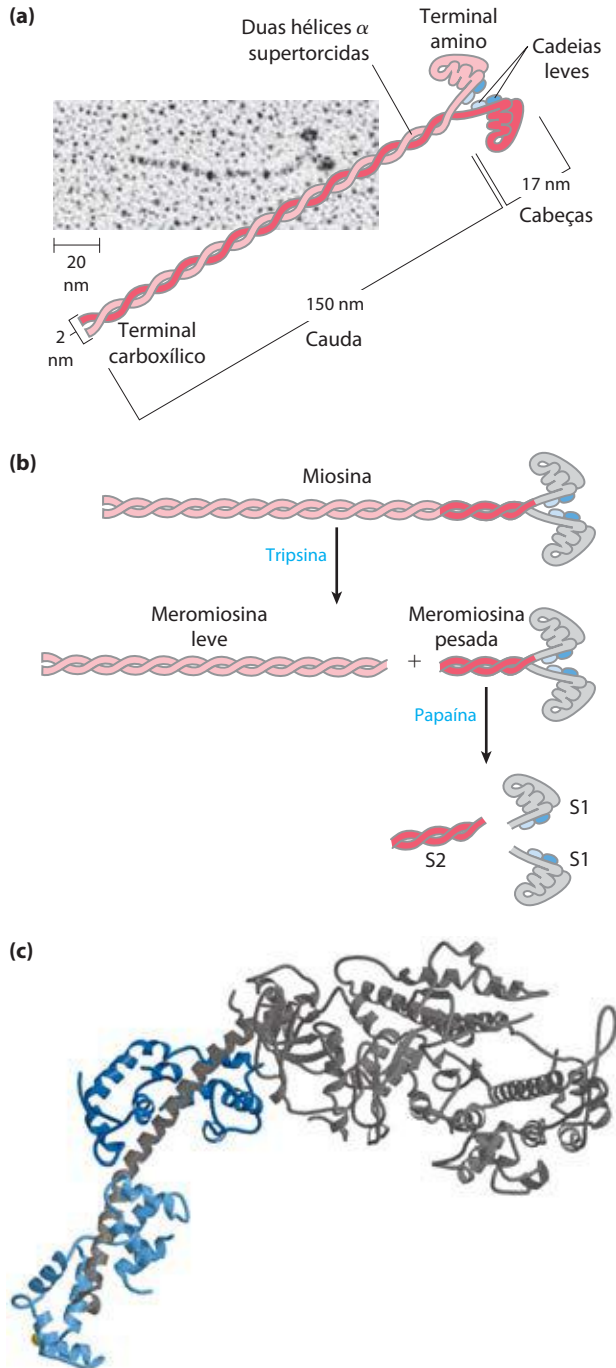



**FIGURA 5-27 Miosina.** **(a)** A miosina tem duas cadeias pesadas (em duas tonalidades de cor-de-rosa), com os terminais carboxílicos formando uma espiral enrolada estendida (cauda) e os terminais amino formando domínios globulares (cabeças). Duas cadeias leves (em azul) associam-se com cada cabeça de miosina. **(b)** A hidrólise com tripsina e papaína separa as cabeças (fragmentos S1) das caudas. **(c)** Representação em fita do fragmento S1 (a partir de coordenadas fornecidas por Ivan Rayment). A cadeia pesada está em cinza e as duas cadeias leves estão em duas tonalidades de azul.

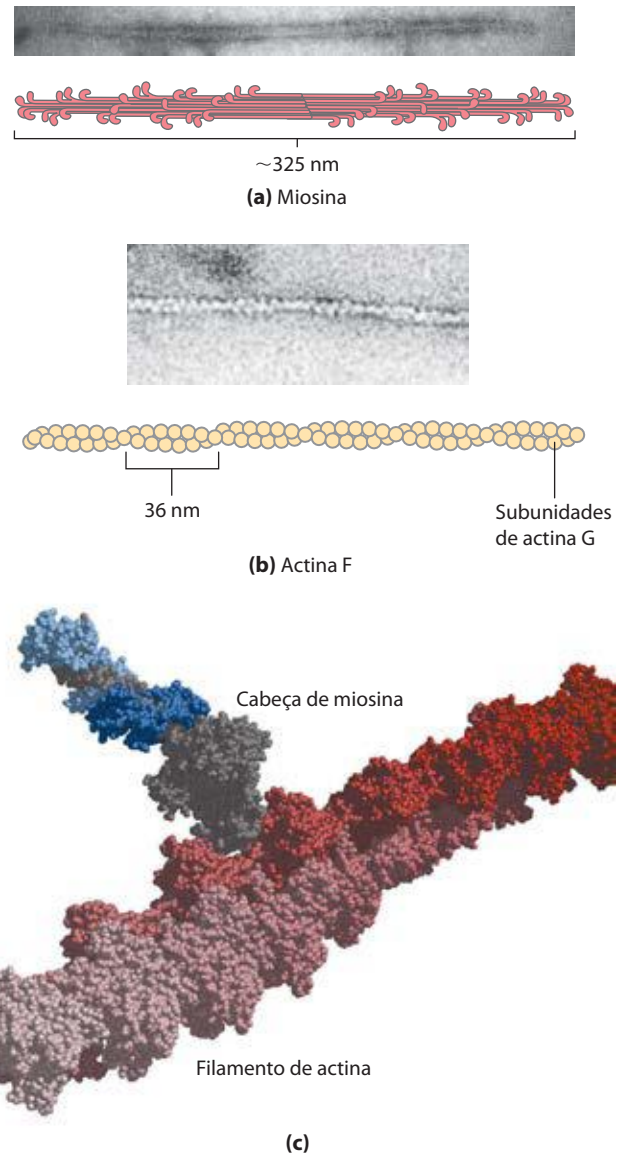



**FIGURA 5-28 Os componentes principais do músculo.** **(a)** A miosina agrega-se e forma uma estrutura bipolar chamada de filamento grosso. **(b)** A actina F é um conjunto filamentoso de monômeros de actina G que polimerizam dois a dois, dando o aspecto de dois filamentos enrolados um sobre o outro em uma orientação à direita. **(c)** Modelo de volume atômico de um filamento de actina (em tonalidade de vermelho), com cabeça de miosina (em cinza e duas tonalidades de azul) ligada a um monômero de actina dentro do filamento (a partir de coordenadas fornecidas por Ivan Rayment).

bastão são o centro da unidade contrátil. Dentro do filamento grosso, várias centenas de moléculas de miosina estão organizadas com suas "caudas" fibrosas associadas de modo a formar uma estrutura bipolar longa. O domínio globular projeta-se de cada uma das extremidades dessa estrutura, em arranjos regulares empilhados.

A segunda proteína importante do músculo, **actina**, é abundante em quase todas as células eucarióticas. No músculo, as moléculas da actina monomérica, chamadas de actina G (actina globular, $M_r$ 42.000), se associam para formar um polímero longo chamado de actina F (actina filamentosa). O **filamento fino** consiste em actina F (Figura 5-28b) juntamente com as proteínas troponina e tropomiosina (apresentadas a seguir). A parte filamentosa dos filamentos finos é montada pela adição sucessiva de moléculas monoméricas de actina a uma das extremidades. Nesse processo, cada monômero se liga ao ATP e o hidrolisa a ADP, de forma que cada molécula de actina no filamento está complexada com ADP. A hidrólise do ATP pela actina funciona somente na montagem dos filamentos; ela não contribui de maneira direta para a energia gasta na contração muscular. Cada monômero de actina no filamento fino pode se ligar firme e especificamente a uma cabeça de miosina (Figura 5-28c).

## Proteínas adicionais organizam os filamentos finos e grossos em estruturas ordenadas

O músculo esquelético consiste em feixes paralelos de **fibras musculares**, sendo cada fibra uma única célula multinucleada muito grande, com 20 a 100 $\mu$m de diâmetro, formada pela fusão de muitas células; uma única fibra frequentemente tem o comprimento do músculo. Cada fibra contém cerca de 1.000 **miofibrilas**, com 2 $\mu$m de diâmetro, cada uma consistindo em um grande número de filamentos finos e grossos regularmente organizados e complexados com outras proteínas (**Figura 5-29**). Um sistema de vesículas membranosas achatadas chamado de **retículo sarcoplasmático** circunda cada miofibrila. As fibras musculares, ao microscópio eletrônico, mostram regiões alternadas de alta e baixa densidade eletrônica, chamadas de **bandas A** e **bandas I** (Figura 5-29b, c). Essas bandas resultam da disposição dos filamentos grossos e finos, que estão alinhados e parcialmente sobrepostos. A banda I é a região do feixe que, em corte transversal, contém somente filamentos finos. A banda A, mais escura, estende-se pelo comprimento do filamento grosso e inclui a região de sobreposição dos filamentos grossos e finos. A banda I é dividida ao meio pela estrutura **disco Z**, perpendicular aos filamentos finos, servindo de âncora para a fixação desses filamentos. A banda A também é dividida por uma linha fina, a **linha M** ou disco M, região de alta densidade eletrônica no centro dos filamentos grossos. A unidade contrátil completa, que consiste em feixes de filamentos grossos intercalados nas duas extremidades com feixes de filamentos finos, é chamada de **sarcômero**. A organização dos feixes intercalados permite o deslizamento dos filamentos entre si (pelo mecanismo descrito a seguir), o que causa o encurtamento progressivo dos sarcômeros (**Figura 5-30**).

Os filamentos finos estão fixados ao disco Z por uma das extremidades em um padrão regular. A montagem inclui as proteínas musculares minoritárias **$\alpha$-actinina**, **desmina** e **vimentina**. Os filamentos finos também contêm uma grande proteína chamada de **nebulina** (com cerca de 7.000

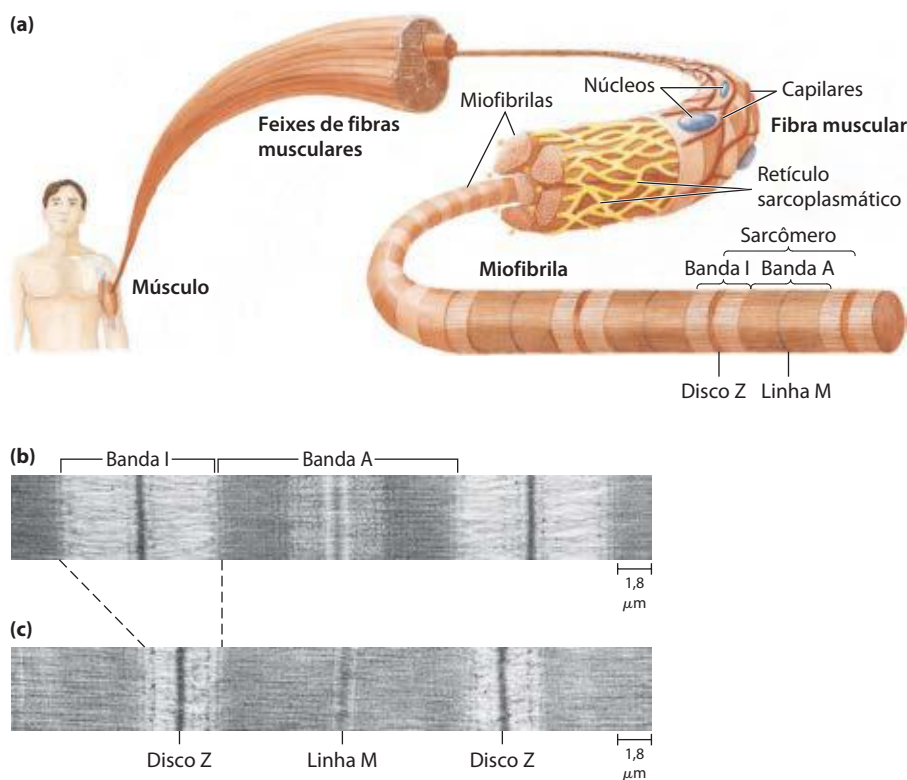
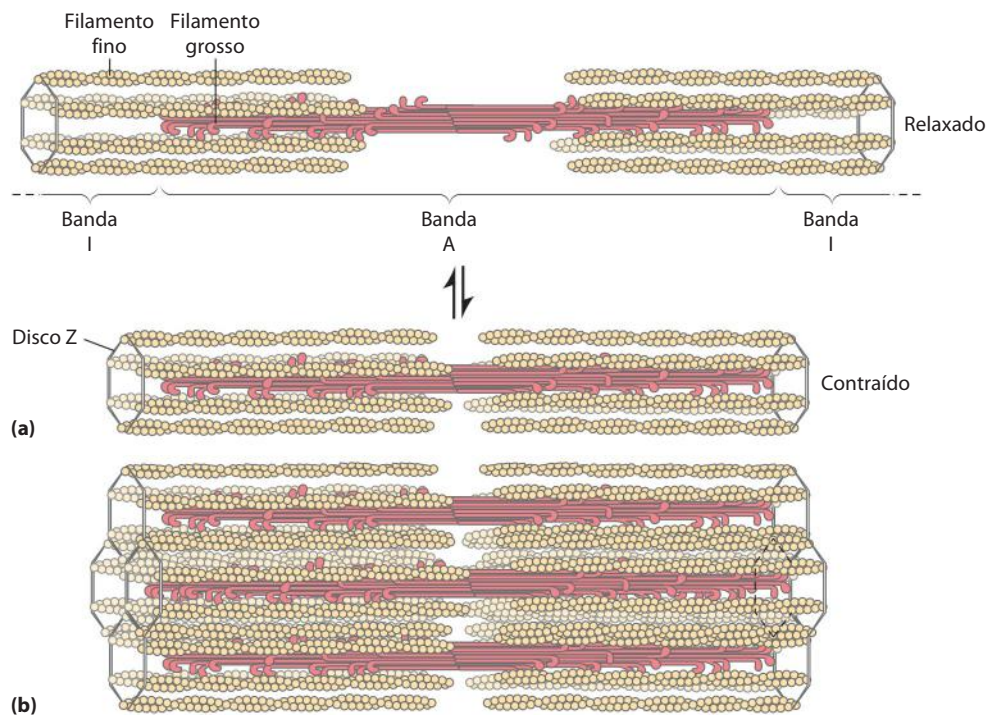



**FIGURA 5-29 Músculo esquelético. (a)** As fibras musculares consistem em células isoladas, alongadas e multinucleadas que se formam pela fusão de muitas células precursoras. Elas são compostas por muitas miofibrilas (para simplificar, estão mostradas aqui somente seis) envoltas pelo retículo sarcoplasmático membranoso. A organização dos filamentos finos e grossos confere à miofibrila uma aparência estriada. Quando o músculo se contrai, as bandas I estreitam-se e os discos Z aproximam-se, conforme pode ser visto nas micrografias eletrônicas em **(b)** um músculo relaxado e **(c)** um músculo contraído.

**FIGURA 5-30 Contração muscular.** Os filamentos grossos são estruturas bipolares criadas pela associação de muitas moléculas de miosina. **(a)** A contração muscular ocorre pelo deslizamento dos filamentos grossos sobre os finos, de forma que os discos Z em bandas I vizinhas se aproximam. **(b)** Os filamentos grossos e finos são intercalados de modo que cada filamento grosso é circundado por seis filamentos finos.

resíduos de aminoácidos), supostamente estruturada como hélice $\alpha$ suficientemente longa para estender-se por todo o comprimento do filamento. A linha M organiza os filamentos grossos da mesma maneira. Eles contêm as proteínas **paramiosina**, **proteína C** e **proteína M**. Outra classe de proteínas chamada de **titinas**, a cadeia polipeptídica única mais longa descoberta até agora (a titina do músculo cardíaco humano tem 26.926 resíduos de aminoácidos), liga os filamentos grossos ao disco Z, conferindo organização adicional à estrutura global. Acredita-se que as proteínas nebulina e titina, entre outras funções, atuem como "réguas moleculares", regulando, respectivamente, o comprimento dos filamentos finos e grossos. A titina se estende do disco Z até a linha M, regulando o comprimento do próprio sarcômero e prevenindo a superextensão do músculo. O comprimento característico do sarcômero varia, nos vertebrados, de um tecido muscular para outro, principalmente devido às variantes diferentes de titina dos tecidos.

## Os filamentos grossos de miosina deslizam sobre os filamentos finos de actina

A interação entre a actina e a miosina, como a que existe entre todas as proteínas e seus ligantes, envolve ligações fracas. Quando o ATP não está ligado à miosina, uma face da cabeça se liga firmemente à actina (**Figura 5-31**). Quando o ATP se liga, ocorre uma série de mudanças conformacionais coordenadas e cíclicas nas quais a miosina libera a subunidade de actina F e se liga a outra subunidade mais distante ao longo do filamento fino.

O ciclo tem quatro etapas principais (Figura 5-31). Na etapa ❶, o ATP liga-se à miosina e uma fenda se abre na molécula, rompendo a interação actina-miosina e liberando a actina. Na etapa ❷, o ATP é hidrolisado, causando, na proteína, uma mudança conformacional para um estado de "alta energia" que move a cabeça de miosina e muda sua orientação em relação ao filamento fino. A miosina então se liga fracamente a uma subunidade de actina F mais próxima do disco Z em comparação com a que foi liberada imediatamente antes. Assim que o fosfato produzido na hidrólise do ATP é liberado da miosina na etapa ❸, ocorre outra mudança de conformação na qual a fenda na miosina se fecha, fortalecendo a ligação actina-miosina. Isto é seguido rapidamente pela etapa ❹, "movimento de força" durante o qual a conformação da cabeça de miosina retorna ao estado de repouso original, mudando sua orientação relativa à actina de forma a puxar sua cauda na direção do disco Z. O ADP é então liberado para completar o ciclo. Cada ciclo gera cerca de 3 a 4 pN (piconewtons) de força e move o filamento grosso de 5 a 10 nm sobre o filamento fino.

Uma vez que existem muitas cabeças de miosina em um filamento grosso, a cada momento algumas (provavelmente 1 a 3%) estão ligadas aos filamentos de actina. Isso impede que os filamentos grossos escorreguem para trás quando uma cabeça de miosina individual libera a subunidade de actina à qual estava ligada. Assim, o filamento grosso desliza ativamente à frente, passando sobre o filamento fino adjacente. Esse processo, coordenado entre muitos sarcômeros em uma fibra muscular, produz a contração muscular.

A interação entre a actina e a miosina deve ser regulada de forma que a contração ocorra somente em resposta a sinais apropriados do sistema nervoso. A regulação é mediada por um complexo de duas proteínas, **tropomiosina** e **troponina** (**Figura 5-32**). A tropomiosina se liga ao filamento fino, bloqueando os sítios de acoplamento para a cabeça de miosina. A troponina é uma proteína que se liga ao $Ca^{2+}$. O impulso nervoso causa liberação de $Ca^{2+}$ do retículo sarcoplasmático. O íon liberado se liga à troponina (mais

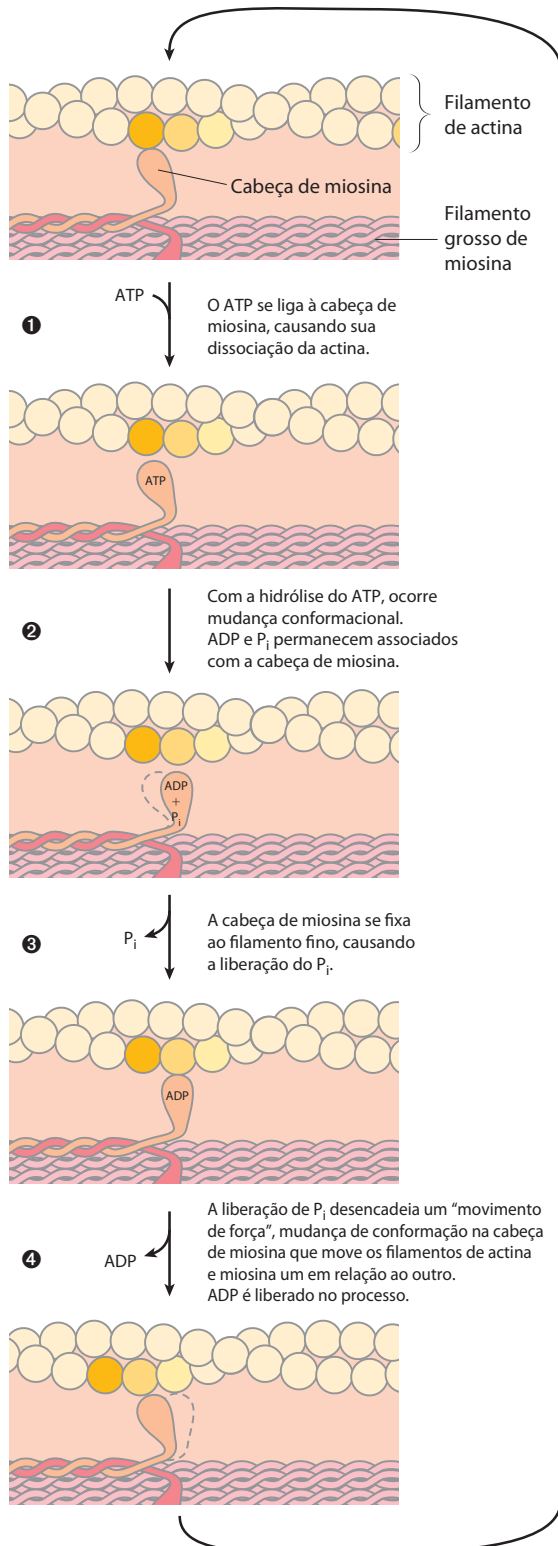



**FIGURA 5-31 Mecanismo molecular da contração muscular.** Mudanças de conformação na cabeça de miosina acopladas a estágios do ciclo hidrolítico do ATP fazem a miosina dissociar-se sucessivamente de uma unidade de actina e se associar com outra unidade mais distante ao longo do filamento. Dessa forma, as cabeças de miosina deslizam ao longo dos filamentos de actina, movendo o conjunto de filamentos grossos para dentro do conjunto de filamentos finos (ver Figura 5-30).

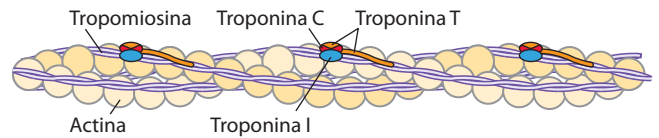



**FIGURA 5-32 Regulação da contração muscular pela tropomiosina e troponina.** A tropomiosina e a troponina estão ligadas à actina F nos filamentos finos. No músculo relaxado, estas duas proteínas organizam-se ao redor dos filamentos de forma a bloquear os sítios de ligação da miosina. A tropomiosina é uma hélice $\alpha$ de duas cadeias supertorcidas, o mesmo motivo estrutural da $\alpha$-queratina (ver Figura 4-11). Ela forma polímeros cabeça-cauda que se enrolam ao redor de duas cadeias de actina. A troponina liga-se ao complexo actina-tropomiosina em intervalos regulares de 38,5 nm. A troponina consiste em três subunidades diferentes: I, C e T. A troponina I impede a ligação da cabeça de miosina à actina; a troponina C tem um sítio de ligação para $Ca^{2+}$; e a troponina T liga todo o complexo à tropomiosina. Quando o músculo recebe um sinal neural para iniciar a contração, o $Ca^{2+}$ é liberado do retículo sarcoplasmático (ver Figura 5-29a) e se liga à troponina C. Isso causa uma mudança conformacional na troponina C que altera as posições da troponina I e da tropomiosina e libera a inibição pela troponina I, permitindo a contração muscular.

uma interação proteína-ligante) e causa mudança conformacional nos complexos tropomiosina-troponina, expondo os sítios de ligação à miosina nos filamentos finos. Segue-se a contração.

O músculo esquelético em atividade requer dois tipos de funções moleculares que são comuns nas proteínas – ligação e catálise. A interação actina-miosina, que é uma interação proteína-ligante semelhante à das imunoglobulinas com o antígeno, é reversível e não altera os participantes. Quando o ATP se liga à miosina, no entanto, é hidrolisado a ADP e $P_i$. A miosina não é somente uma proteína de ligação à actina, ela é também uma ATPase – uma enzima. A função das enzimas na catálise das transformações químicas é o tópico do próximo capítulo.

## RESUMO 5.3 Interações proteicas moduladas por energia química: actina, miosina e motores moleculares

- As interações proteína-ligante alcançam um grau especial de organização temporal e espacial com as proteínas motoras. A contração muscular resulta de interações entre a miosina e a actina, acopladas à hidrólise do ATP pela miosina.
- A miosina consiste em duas cadeias pesadas e quatro cadeias leves, formando um domínio espiral enrolado fibroso (cauda) e um domínio globular (cabeça). As moléculas de miosina são organizadas em filamentos grossos que deslizam sobre os filamentos finos compostos principalmente por actina. A hidrólise do ATP na miosina é acoplada a uma série de mudanças conformacionais na cabeça de miosina, levando à sua dissociação de uma subunidade da actina F e sua associação com outra, mais distante ao longo do filamento fino. Assim, a miosina desliza ao longo dos filamentos de actina.
- A contração muscular é estimulada pela liberação de $Ca^{2+}$ do retículo sarcoplasmático. O $Ca^{2+}$ se liga à proteína troponina, provocando uma mudança na conformação do complexo troponina-tropomiosina que desencadeia o ciclo de interações actina-miosina.

## Termos-chave

*Os termos em negrito estão definidos no glossário.*

**ligante** 157
**sítio de ligação** 157
**encaixe induzido** 157
**heme** 158
**porfirina** 158
globinas 159
expressão de equilíbrio 160
constante de associação, $K_a$ 160
**constante de dissociação, $K_d$** 160
**proteína alostérica** 166
equação de Hill 167
efeito Bohr 170
**linfócitos** 174
**anticorpo** 174
**imunoglobulina** 174
**linfócito B** ou **célula B** 174
**linfócito T** ou **célula T** 174
**antígeno** 175
**epitopo** 175
**hapteno** 175
padrão de enovelamento das imunoglobulinas 175
**anticorpos policlonais** 178
**anticorpos monoclonais** 178
Elisa 179
***imunoblot*** 179
***Western blot*** 179
**miosina** 179
**actina** 181
**sarcômero** 181

## Leituras adicionais

### Proteínas de ligação ao oxigênio


**Changeux, J.P. & Edelstein, S.J.** (2005) Allosteric mechanisms of signal transduction *Science* **308**, 1424–1428.

**Koder, R.L., Anderson, J.L.R., Solomon, L.A., Reddy, K.S., Moser, C.C., & Dutton, P.L.** (2009) Design and engineering of an $O_2$ transport protein. *Nature* **458**, 305–309.

**Koshland, D.E., Jr., Nemethy, G., & Filmer, D.** (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* **6**, 365–385.
O artigo que apresentou o modelo sequencial.

**Laberge, M. & Yonetani, T.** (2007) Common dynamics of globin family proteins. *IUBMB Life* **59**, 528–534.

**Monod, J., Wyman, J., & Changeux, J.-P.** (1965) On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* **12**, 88–118.
O modelo combinado foi proposto pela primeira vez neste artigo, que é considerado um marco.

**Perutz, M.F., Wilkinson, A.J., Paoli, M., & Dodson, G.G.** (1998) The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 1–34.


### Proteínas do sistema imune


**Cooper, M.D. & Alder, M.N.** (2006) The evolution of adaptive immune systems. *Cell* **124**, 815–822.
Análise interessante rastreando as origens do nosso sistema imune.

**Flajnik, M.F. & Kasahara, M.** (2010) Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 47–59.

**Kindt, T.J., Osborne, B.A., & Goldsby, R.A.** (2007) *Kuby Immunology*, 6th edn, W. H. Freeman and Company, New York.

**Ploegh, H.L.** (1998) Viral strategies of immune evasion. *Science* **280**, 248–253.

**Yewdell, J.W. & Haeryfar, S.M.M.** (2005) Understanding presentation of viral antigens to CD8 (+) T cells in vivo: the key to rational vaccine design. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 651–682.


### Motores moleculares


**Geeves, M.A. & Holmes, K.C.** (1999) Structural mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 687–728.

**Geigel, C. & Schmidt, C.F.** (2011) Moving into the cell: singlemolecule studies of molecular motors in complex environments. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 163–176.

**Huxley, H.E.** (1998) Getting to grips with contraction: the interplay of structure and biochemistry. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 84–87.
Interessante perspectiva histórica sobre a elucidação do mecanismo de contração muscular.

**Molloy, J.E. & Veigel, C.** (2003) Myosin motors walk the walk. *Science* **300**, 2045–2046.

**Rayment, I.** (1996) The structural basis of the myosin ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 15,850–15,853.
Examina o mecanismo de contração muscular por uma perspectiva estrutural.

**Rayment, I. & Holden, H.M.** (1994) The three-dimensional structure of a molecular motor. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 129–134.

**Vale, R.D.** (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* **112**, 467–480.


## Problemas

**1. Relação entre afinidade e constante de dissociação.** A proteína A tem um sítio de ligação para o ligante X com uma $K_d$ de $10^{-6}$ M. A proteína B tem um sítio de ligação para o mesmo ligante com uma $K_d$ de $10^{-9}$ M. Qual das proteínas tem a maior afinidade pelo ligante X? Explique seu raciocínio. Converta a $K_d$ em $K_a$ para ambas as proteínas.

**2. Cooperatividade negativa.** Qual das seguintes situações produz uma curva de Hill com $n_H < 1,0$? Explique seu raciocínio em cada caso.

(a) A proteína tem múltiplas subunidades, cada uma com um único sítio de interação com o ligante. A ligação a um sítio reduz a afinidade dos outros sítios pelo ligante.

(b) A proteína é uma cadeia polipeptídica única com dois sítios de ligação, e cada um tem uma afinidade diferente pelo ligante.

(c) A proteína é uma cadeia polipeptídica única com um único sítio de ligação. Quando purificada, a preparação proteica é heterogênea, contendo algumas moléculas parcialmente desnaturadas e, assim, com afinidade mais baixa pelo ligante.

**3. Afinidade da hemoglobina pelo oxigênio.** Qual é o efeito das seguintes mudanças sobre a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio? (a) Redução no pH do plasma sanguíneo de 7,4 para 7,2. (b) Redução na pressão parcial de $CO_2$ no pulmão de 6 kPa (segurar a respiração) para 2 kPa (respiração normal). (c) Aumento no nível de BPG de 5 mM (nível do mar) para 8 mM (grande altitude). (d) Aumento no CO de 1 parte por milhão (ppm) de uma atmosfera normal externa para 30 ppm em uma casa que tenha um forno com mau funcionamento ou com vazamento.

**4. Interação reversível com o ligante I.** A proteína calcineurina se liga à proteína calmodulina com uma taxa de associação de $8,9 \times 10^3$ $M^{-1}s^{-1}$ e uma constante de dissociação total, $K_d$, de 10 nM. Calcule a taxa de dissociação, $k_d$, incluindo as unidades apropriadas.

**5. Interação reversível com o ligante II.** Três receptores proteicos de membrana se ligam firmemente a um hormônio. Com base nos dados da tabela abaixo, (a) qual é a $K_d$ para a

ligação do hormônio pela proteína 2? (Inclusive unidades adequadas). (b) Qual dessas proteínas se liga *mais* firmemente ao seu hormônio?

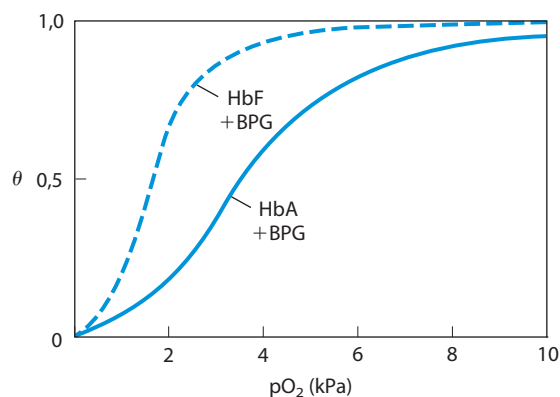
| Concentração de hormônio (nM) | $\theta$ | | |
|---|---|---|---|
| | Proteína 1 | Proteína 2 | Proteína 3 |
| 0,2 | 0,048 | 0,29 | 0,17 |
| 0,5 | 0,11 | 0,5 | 0,33 |
| 1 | 0,2 | 0,67 | 0,5 |
| 4 | 0,5 | 0,89 | 0,8 |
| 10 | 0,71 | 0,95 | 0,91 |
| 20 | 0,83 | 0,97 | 0,95 |
| 50 | 0,93 | 0,99 | 0,98 |

**6. Cooperatividade na hemoglobina.** Sob condições adequadas, a hemoglobina se dissocia em suas quatro subunidades. A subunidade $\alpha$ isolada se liga ao $O_2$, mas a curva de saturação para o $O_2$ é hiperbólica e não sigmoide. Além disso, a ligação do oxigênio à subunidade $\alpha$ não é afetada pela presença de $H^+$, $CO_2$ ou BPG. Qual dessas observações revela a fonte da cooperatividade na hemoglobina?

**7. Comparação entre as hemoglobinas fetal e materna.** Estudos sobre o transporte de $O_2$ em mamíferos prenhes mostram que as curvas de saturação do $O_2$ do sangue fetal e do sangue materno são muito diferentes quando medidas sob as mesmas condições. Os eritrócitos fetais contêm uma variante estrutural da hemoglobina, HbF, que consiste em duas subunidades $\alpha$ e duas subunidades $\gamma$ ($\alpha_2\gamma_2$), enquanto os eritrócitos maternos contêm HbA ($\alpha_2\beta_2$).

(a) Qual das hemoglobinas tem uma afinidade mais alta pelo $O_2$ em condições fisiológicas, HbA ou HbF? Explique.

(b) Qual é o significado fisiológico das afinidades diferentes pelo $O_2$?

(c) Quando todo o BPG é cuidadosamente removido das amostras de HbA e HbF, as curvas de saturação medidas (e, consequentemente, a afinidade pelo $O_2$) são deslocadas para a esquerda. Contudo, a HbA tem agora uma afinidade maior pelo oxigênio do que a HbF. Quando o BPG é reintroduzido, as curvas de saturação retornam ao normal, conforme mostrado no gráfico. Qual é o efeito do BPG sobre a afinidade da hemoglobina pelo $O_2$? Como as informações dadas podem ser usadas para explicar as diferentes afinidades das hemoglobinas fetal e materna?

**8. Variantes da hemoglobina.** Existem quase 500 variantes naturais da hemoglobina. A maioria resulta da substituição de um único aminoácido em uma cadeia polipeptídica da globina. Algumas variantes produzem doenças clínicas, embora nem todas tenham efeitos deletérios. Segue-se uma pequena amostra.

HbS (Hb falciforme): substitui um Glu por uma Val na superfície
Hb Cowtown: elimina um par iônico envolvido na estabilização do estado T
Hb Memphis: substitui um resíduo polar sem carga por outro de tamanho semelhante na superfície
Hb Bibba: substitui uma Pro por uma Leu envolvida em uma hélice $\alpha$
Hb Milwaukee: substitui um Glu por uma Val
Hb Providence: substitui uma Asn por uma Lys que normalmente se projeta para a cavidade central do tetrâmero
Hb Philly: substitui uma Phe por uma Tyr, rompendo as ligações de hidrogênio na interface $\alpha_1\beta_1$

Explique suas escolhas para cada uma das seguintes afirmações:

(a) A Hb variante com *menos* probabilidade de causar sintomas patológicos.

(b) A(s) variante(s) mais provável(eis) de ter(em) valores de pI diferentes dos da HbA em um gel de focalização isoelétrica.

(c) A(s) variante(s) mais provável(eis) de mostrar(em) uma redução na ligação ao BPG e um aumento na afinidade total pelo oxigênio.

**9. Ligação do oxigênio e a estrutura da hemoglobina.** Um grupo de bioquímicos usa a engenharia genética para modificar a região da interface entre as subunidades da hemoglobina. As hemoglobinas variantes resultantes estão presentes em solução como dímeros $\alpha\beta$ (poucas, se alguma, na forma de tetrâmeros $\alpha_2\beta_2$). Essas variantes são capazes de se ligar ao oxigênio de forma mais fraca ou mais forte? Explique sua resposta.

**10. Ligação reversível (porém forte) a um anticorpo.** Um anticorpo se liga a um antígeno com uma $K_d$ de $5 \times 10^{-8}$ M. Em qual concentração do antígeno $\theta$ será (a) 0,2, (b) 0,5, (c) 0,6, (d) 0,8?

**11. O uso de anticorpos para sondar a relação estrutura-função nas proteínas.** Um anticorpo monoclonal se liga à actina G, mas não à actina F. O que isso informa sobre o epítopo reconhecido pelo anticorpo?

**12. O sistema imune e as vacinas.** Um organismo hospedeiro necessita de tempo, em geral alguns dias, para montar uma resposta imune contra um antígeno novo, mas as células de memória permitem uma resposta rápida contra patógenos previamente encontrados. Uma vacina para proteger contra uma determinada infecção viral em geral consiste no vírus atenuado ou morto ou em proteínas isoladas da capa proteica viral. A vacina, quando injetada em um paciente humano, geralmente não causa infecção ou doença, mas "ensina" o sistema imune a reconhecer a partícula viral como um patógeno, estimulando a produção de células de memória. Em uma infecção subsequente, essas células podem se ligar ao vírus e desencadear uma resposta imune rápida. Alguns patógenos, incluindo o HIV, desenvolveram mecanismos para escapar da resposta imune, tornando difícil ou impossível o desenvolvimento de vacinas efetivas contra eles. Que estratégia um patógeno usaria para escapar do sistema imune? Suponha que os anticorpos e/ou os receptores de células T do hospedeiro estejam disponíveis para se ligar a qualquer estrutura na superfície do patógeno e que, uma vez ligados, o patógeno seja destruído.

**13. Como o ser humano se torna um "cadáver".** Quando um vertebrado morre, seus músculos enrijecem, pois são

privados de ATP, estado chamado *rigor mortis*. Explique a base molecular do estado de rigidez.

**14. Os sarcômeros a partir de outro ponto de vista.** A simetria dos filamentos finos e grossos em um sarcômero é tal que geralmente seis filamentos finos circundam um filamento grosso em um arranjo hexagonal. Desenhe um corte transversal de uma miofibrila nos seguintes pontos: (a) na linha M; (b) toda a banda I; (c) toda a região densa da banda A; (d) toda a região menos densa da banda A adjacente à linha M (ver Figura 5-29b, c).

## Bioquímica na internet

**15. Lisozima e anticorpos.** Para perceber totalmente como as proteínas funcionam em uma célula, é importante ter uma visão tridimensional de como as proteínas interagem com outros componentes celulares. Felizmente, isto é possível pela utilização de bancos de dados de proteínas com base na internet e pelas vantagens da visualização molecular tridimensional com o uso do Jmol, um visualizador grátis, fácil de usar e compatível com a maioria dos sistemas operacionais e navegadores.

Neste exercício, você vai examinar as interações entre a enzima lisozima (Capítulo 4) e a porção Fab do anticorpo antilisozima. Use o identificador PDB 1FDL para explorar a estrutura do complexo lisozima-fragmento Fab da IgG1 (complexo antígeno-anticorpo). Para responder às seguintes questões, use a informação da página Structure Summary no Protein Data Bank (www.rcsb.org) e examine a estrutura usando Jmol ou um visualizador similar.

(a) No modelo tridimensional, qual cadeia corresponde ao fragmento do anticorpo e qual corresponde ao antígeno, lisozima?

(b) Que tipo de estrutura secundária predomina neste fragmento Fab?

(c) Quantos resíduos de aminoácidos existem nas cadeias leves e nas cadeias pesadas do fragmento Fab? E na lisozima? Estime a porcentagem da lisozima que interage com o sítio de ligação ao antígeno do fragmento do anticorpo.

(d) Identifique os resíduos específicos de aminoácidos na lisozima e nas regiões variáveis das cadeias leves e pesadas do Fab que estão na interface antígeno-anticorpo. Os resíduos estão contíguos na sequência primária das cadeias polipeptídicas?

**16. Explorando as interações reversíveis das proteínas e dos ligantes com gráficos ao vivo.** Utilize os gráficos ao vivo para as Equações 5-8, 5-11, 5-14 e 5-16 para trabalhar nos exercícios que se seguem.

(a) Interação reversível de um ligante com uma proteína simples, sem cooperatividade. Para a Equação 5-8, monte um gráfico de $\theta$ *versus* [L] (eixo vertical e horizontal, respectivamente). Examine as curvas geradas quando $K_d$ é estabelecida em 5, 10, 20 e 100 $\mu$M. Maior afinidade da proteína pelo ligante significa mais ligação em concentrações mais baixas do ligante. Suponha que quatro proteínas diferentes exibam esses quatro valores de $K_d$ para o ligante L. Qual das proteínas terá a maior afinidade por L?

Examine a curva gerada quando $K_d = 10$ $\mu$M. Quanto aumenta o $\theta$ quando [L] aumenta de 0,2 para 0,4 $\mu$M? Quanto aumenta o $\theta$ quando [L] aumenta de 40 para 80 $\mu$M?

Você pode fazer o mesmo exercício para a Equação 5-11. Converta [L] em $pO_2$ e $K_d$ em $P_{50}$. Examine as curvas geradas quando $P_{50}$ é estabelecido em 0,5, 1, 2 e 10 kPa. Na curva gerada quando $P_{50} = 1$ kPa, quanto o $\theta$ altera quando a $pO_2$ aumenta de 0,02 para 0,04 kPa? E de 4 para 8 kPa?

(b) Interação cooperativa de um ligante com uma proteína multimérica. Usando a Equação 5-14, gere uma curva de ligação para uma proteína e o ligante com $K_d = 10$ $\mu$M e $n = 3$. Observe a definição alterada de $K_d$ na Equação 5-16. No mesmo gráfico, adicione uma curva para uma proteína com $K_d = 20$ $\mu$M e $n = 3$. Agora veja como ambas as curvas mudam quando você muda para $n = 4$. Gere gráficos de Hill (Equação 5-16) para cada um desses casos. Para $K_d = 10$ $\mu$M e $n = 3$, o que é $\theta$ quando [L] = 20 $\mu$M?

(c) Explore mais essas equações variando todos os parâmetros usados anteriormente.

## Problema de análise de dados

**17. Função proteica.** Durante a década de 1980, as estruturas da actina e da miosina eram conhecidas somente na resolução mostrada na Figura 5-28a, b. Embora os pesquisadores soubessem que a porção S1 da miosina se liga à actina e hidrolisa ATP, existia um grande debate sobre onde era gerada a força de contração na molécula da miosina. Nessa época, foram propostos dois modelos concorrentes para o mecanismo de geração de força.

No modelo da "dobradiça", S1 se liga à actina, mas a força de tração era gerada pela contração da "região de dobradiça" na cauda de miosina. A região de dobradiça está na porção meromiosina pesada da molécula da miosina, próximo de onde a meromiosina leve é hidrolisada pela tripsina (ver Figura 5-27b). Este é aproximadamente o ponto marcado como "duas hélices $\alpha$ supertorcidas" na Figura 5-27a. No modelo "S1", a força de tração era gerada na própria "cabeça" de S1 e a cauda servia somente para suporte estrutural.

Muitos experimentos foram realizados, mas não forneceram evidências conclusivas. Em 1987, na Universidade de Stanford, James Spudich e colaboradores publicaram um estudo que, embora inconclusivo, contribuiu para a resolução dessa controvérsia.

As técnicas do DNA recombinante não estavam suficientemente desenvolvidas para tratar este problema *in vivo*, de modo que Spudich e colaboradores usaram um ensaio interessante de motilidade *in vitro*. A alga *Nitella* tem células extremamente longas, com vários centímetros de comprimento e cerca de 1 mm de diâmetro. Essas células têm fibras de actina ao longo do seu eixo maior, e as células podem ser cortadas ao longo de seu comprimento para expor as fibras. Spudich e seu grupo observaram que esferas revestidas com miosina "caminhavam" ao longo dessas fibras na presença de ATP, exatamente como a miosina faz no músculo em contração.

Para esses experimentos, eles usaram um método mais específico de ligar a miosina às esferas. As "esferas" eram agrupamentos de bactérias mortas (*Staphylococcus aureus*). Essas células têm na sua superfície uma proteína que se liga à região Fc das moléculas de anticorpo (Figura 5-21a). Os anticorpos, por sua vez, se ligam a vários locais (não conhecidos) ao longo da cauda da molécula de miosina. Os complexos esfera-anticorpo-miosina preparados com moléculas intactas de miosina se moveram ao longo das fibras de actina de *Nitella* na presença de ATP.

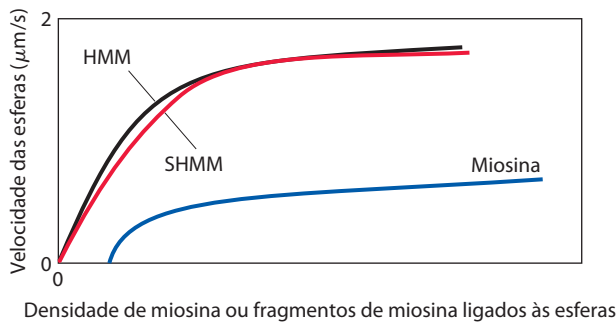
(a) Faça um desenho esquemático mostrando a aparência do complexo esfera-anticorpo-miosina no nível molecular.

(b) Por que é necessário ATP para as esferas se moverem ao longo das fibras de actina?

(c) Spudich e colaboradores usaram anticorpos que se ligam à cauda de miosina. Por que esse experimento não teria sucesso caso fosse usado um anticorpo que interagisse com a porção de S1 que normalmente se liga à actina?

Para ajudar a identificar a parte da miosina responsável pela produção de força, Spudich e colaboradores usaram tripsina e produziram duas moléculas parciais de miosina (ver Figura 5-27b): (1) meromiosina pesada (HMM), obtida por digestão branda da miosina por tripsina; HMM consiste em S1 mais a parte da cauda que inclui a dobradiça; e (2) meromiosina pesada curta (SHMM), obtida por digestão mais extensa da HMM; SHMM consiste em S1 mais uma parte mais curta da cauda que não inclui a dobradiça. Digestão rápida da miosina com tripsina produz HMM e meromiosina leve, por quebra de uma única ligação peptídica específica na molécula da miosina.

(d) Por que a tripsina ataca essa ligação peptídica antes de qualquer outra na miosina?

Spudich e colaboradores prepararam complexos de esfera-anticorpo-miosina com quantidades variáveis de miosina, HMM e SHMM e mediram suas velocidades de deslocamento ao longo das fibras de actina da *Nitella* na presença de ATP. O gráfico abaixo mostra seus resultados.

(e) Qual dos modelos ("S1" ou "dobradiça") é consistente com esses resultados? Explique seu raciocínio.

(f) Dê uma explicação plausível para o fato de a velocidade das esferas aumentar com o aumento da densidade da miosina.

(g) Dê uma explicação plausível para o fato de a velocidade das esferas alcançar um platô em alta densidade de miosina.

A digestão mais extensa pela tripsina, necessária para a produção de SHMM, tem um efeito colateral: outra quebra específica do esqueleto polipeptídico da miosina além da quebra na cauda. Essa segunda quebra ocorre na cabeça S1.

(h) Com base nessa informação, por que é surpreendente que SHMM ainda seja capaz de mover as esferas ao longo das fibras de actina?

(i) Como se confirmou, a estrutura terciária da cabeça S1 permanece intacta na SHMM. Dê uma explicação plausível para o fato de a proteína permanecer intacta e funcional mesmo que o esqueleto polipeptídico tenha sido rompido e não seja mais contínuo.

## Referência

**Hynes, T.R., Block, S.M., White, B.T., & Spudich, J.A.** (1987) Movement of myosin fragments in vitro: domains involved in force production. *Cell* **48**, 953-963.

6

# Enzimas



São duas as condições fundamentais para haver vida. Primeiro, o organismo deve ser capaz de se autorreplicar (tópico considerado na Parte III); segundo, ele deve ser capaz de catalisar reações químicas com eficiência e seletividade. A importância central da catálise pode parecer surpreendente, mas é fácil de demonstrar. Como foi descrito no Capítulo 1, os sistemas vivos fazem uso da energia do ambiente. Muitos humanos, por exemplo, consomem quantidades substanciais de sacarose (o açúcar comum) como combustível, geralmente na forma de comidas e bebidas doces. A conversão de sacarose em $CO_2$ e $H_2O$, em presença de oxigênio, é um processo altamente exergônico, liberando energia livre que pode ser usada para pensar, mover-se, sentir gostos e enxergar. Entretanto, um saco de açúcar pode permanecer na prateleira por anos a fio sem qualquer conversão evidente em $CO_2$ e $H_2O$. Embora esse processo químico seja termodinamicamente favorável, ele é muito lento. Mesmo assim, quando a sacarose é consumida por seres humanos (ou por qualquer outro organismo), ela libera sua energia química em segundos. A diferença é a catálise. Sem catálise, as reações químicas como aquelas da oxidação da sacarose poderão não ocorrer na escala de tempo adequada e então não podem sustentar a vida.

Neste capítulo, o foco se voltará para os catalisadores das reações dos sistemas biológicos: as enzimas, as proteínas mais notáveis e mais altamente especializadas. As enzimas têm um poder catalítico extraordinário, geralmente muito maior do que os catalisadores sintéticos ou inorgânicos. Elas têm um alto grau de especificidade para os seus respectivos substratos, aceleram as reações químicas e atuam em soluções aquosas sob condições suaves de temperatura e pH. Poucos catalisadores não biológicos têm esse conjunto de propriedades.

As enzimas estão no centro de cada um dos processos bioquímicos. Atuando em sequências organizadas, elas catalisam cada uma das reações das centenas de etapas que degradam as moléculas dos nutrientes, que conservam e transformam energia química e que constroem as macromoléculas biológicas a partir de precursores elementares.

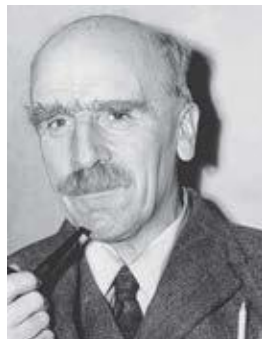
O estudo das enzimas tem imensa importância prática. Em algumas doenças, especialmente nas doenças genéticas hereditárias, pode haver uma deficiência ou mesmo ausência total de uma ou mais enzimas. Outras doenças podem ser causadas pela atividade excessiva de determinada enzima. A determinação das atividades de enzimas no plasma sanguíneo, nas hemácias ou em amostras de tecidos é importante no diagnóstico de certas enfermidades. Muitos medicamentos agem por interação com enzimas. As enzimas também são ferramentas importantes na engenharia química, tecnologia de alimentos e agricultura.

O capítulo inicia com descrições das propriedades das enzimas e os princípios que embasam seu poder catalítico, depois aborda a cinética enzimática, disciplina que fornece muito do arcabouço para qualquer discussão a respeito de enzimas. Serão dados exemplos específicos de mecanismos de ação de algumas enzimas de modo a ilustrar os princípios apresentados no início do capítulo. Por fim, o capítulo discute como a atividade das enzimas é regulada.

## 6.1 Introdução às enzimas

Boa parte da história da bioquímica é a história da pesquisa sobre enzimas. A catálise biológica foi reconhecida e descrita nos final dos anos de 1700 em estudos da digestão de carne por secreções do estômago. A pesquisa continuou no século seguinte examinando a conversão do amido em açúcar pela saliva e por vários extratos de plantas. Por volta de 1850, Louis Pasteur concluiu que a fermentação de açúcar em álcool por leveduras é catalisada por "fermentos". Ele postulou que esses fermentos eram inseparáveis da estrutura das células de levedura vivas. Esse ponto de vista, chamado de vitalismo, prevaleceu por décadas. Então, em 1897, Eduard Buchner descreveu que extratos de levedura podiam fermentar açúcar em álcool, provando que a fermentação era feita por moléculas que continuavam ativas mesmo após serem removidas das células. Os experimentos de Buchner, ao mesmo tempo, marcaram o final da visão vitalista e o alvorecer da ciência bioquímica. Posteriormente, Frederick W. Kühne deu o nome de **enzimas** para as moléculas detectadas por Buchner.

Eduard Buchner, 1860-1917

James Sumner, 1887-1955

J. B. S. Haldane, 1892-1964

O isolamento e a cristalização da urease por James Sumner em 1926 foi uma quebra de paradigma nos estudos iniciais sobre enzimas. Sumner descobriu que os cristais de urease constituíam-se totalmente de proteína e postulou que toda enzima é uma proteína. Na ausência de outros exemplos, essa ideia permaneceu controversa por algum tempo. Somente na década de 1930 é que a conclusão de Sumner foi amplamente aceita, isso depois que John Northrop e Moses Kunitz cristalizaram a pepsina, a tripsina e outras enzimas digestivas e descobriram que todas elas são proteínas. Durante esse período, J. B. S. Haldane escreveu um tratado intitulado *Enzymes*. Embora a natureza molecular das enzimas não estivesse totalmente reconhecida, Haldane fez a notável suposição de que ligações fracas entre a enzima e seu substrato poderiam ser usadas para catalisar a reação. Essa ideia ainda permanece essencial no conhecimento da catálise enzimática.

A partir da última parte do século XX, milhares de enzimas foram purificadas, suas estruturas elucidadas e seus mecanismos explicados.

## A maioria das enzimas é proteína

Exceto por um pequeno grupo de moléculas de RNA catalíticas (Capítulo 26), todas as enzimas são proteínas. A atividade catalítica depende da integridade das suas conformações nativas. Se uma enzima for desnaturada ou dissociada nas suas subunidades, geralmente a atividade catalítica é perdida. Se uma enzima for degradada até os aminoácidos que a compõem, a atividade catalítica é sempre destruída. Então, as estruturas proteicas primária, secundária, terciária e quaternária das enzimas são essenciais para a atividade catalítica.

As enzimas, assim como as outras proteínas, têm pesos moleculares variando de cerca de 12.000 a mais de um milhão. Algumas enzimas não necessitam de outros grupos químicos além dos seus próprios resíduos de aminoácidos. Outras necessitam de um componente químico adicional denominado **cofator**, que pode ser um ou mais íons inorgânicos como $Fe^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Mn^{2+}$ ou $Zn^{2+}$ (Tabela 6-1) ou uma molécula orgânica ou metalorgânica complexa, denominada **coenzima**. As coenzimas agem como carreadores transitórios de grupos funcionais específicos (Tabela 6-2). A maioria deles é derivada das vitaminas, nutrientes orgânicos cuja presença na dieta é necessária em pequenas quantidades. As coenzimas serão estudadas com mais detalhe à medida que forem abordadas as vias metabólicas na Parte II. Algumas enzimas necessitam *tanto* de uma coenzima *quanto* de um ou mais íons metálicos para terem atividade. Uma coenzima ou um íon metálico que se ligue muito firmemente, ou mesmo covalentemente, a uma enzima é denominado **grupo prostético**. Uma enzima completa, cataliticamente ativa junto com a sua coenzima e/ou íons metálicos, é denominada **holoenzima**. A parte proteica de uma dessas enzimas é denominada **apoenzima** ou **apoproteína**. Finalmente, algumas enzimas são modificadas covalentemente por fosforilação, glicosilação e outros processos. Muitas dessas modificações estão envolvidas na regulação da atividade enzimática.

## As enzimas são classificadas segundo as reações que catalisam

Muitas enzimas receberam seus nomes pela adição do sufixo "ase" ao nome dos seus substratos ou a uma palavra que descreve sua atividade. Assim, a urease catalisa a hidrólise da ureia e a DNA-polimerase catalisa a polimerização de nucleotídeos para formar DNA. Outras enzimas foram batizadas pelos seus descobridores em razão de uma função ampla, antes que fosse conhecida a reação específica catalisada por elas. Por exemplo, uma enzima conhecida por atuar na digestão de alimentos foi denominada pepsina, do grego *pepsis* (digestão), e a lisozima foi denominada pela sua capacidade de lisar (degradar) a parede de bactérias. Outras foram ainda denominadas a partir de sua fonte: a tripsina, denominada em parte do grego *tryein* (desgastar), foi obtida esfregando tecido pancreático com glicerina. Às vezes, a mesma enzima tem dois ou mais nomes, ou duas enzimas têm o mesmo nome. Devido a essa ambiguidade e também ao número cada vez maior de enzimas que são

**TABELA 6-1** Alguns íons inorgânicos que servem de cofatores para enzimas

| Íons | Enzimas |
|---|---|
| $Cu^{2+}$ | Citocromo-oxidase |
| $Fe^{2+}$ ou $Fe^{3+}$ | Citocromo-oxidase, catalase, peroxidase |
| $K^{+}$ | Piruvato-cinase |
| $Mg^{2+}$ | Hexocinase, glicose-6-fosfatase, piruvato-cinase |
| $Mn^{2+}$ | Arginase, ribonucleotídeo-redutase |
| Mo | Dinitrogenase |
| $Ni^{2+}$ | Urease |
| $Zn^{2+}$ | Anidrase carbônica, álcool-desidrogenase, carboxipeptidases A e B |

**TABELA 6-2** Algumas coenzimas que servem como carreadores transitórios de átomos ou grupos funcionais específicos

| Coenzima | Exemplo de grupo químico transferido | Precursor presente na dieta de mamíferos |
|---|---|---|
| Biocina | $CO_2$ | Biotina |
| Coenzima A | Grupos acil | Ácido pantotênico e outros compostos |
| 5′-Desoxiadenosilcobalamina (coenzima $B_{12}$) | Átomos de H e grupos alquil | Vitamina $B_{12}$ |
| Flavina-adenina-dinucleotídeo | Elétrons | Riboflavina (vitamina $B_2$) |
| Lipoato | Elétrons e grupos acil | Não é necessário na dieta |
| Nicotinamida-adeninadinucleotídeo | Íon hidrido (**:**$H^-$) | Ácido nicotínico (niacina) |
| Piridoxal-fosfato | Grupos amino | Piridoxina (vitamina $B_6$) |
| Tetra-hidrofolato | Grupos de um carbono | Folato |
| Tiamina-pirofosfato | Aldeídos | Tiamina (vitamina $B_1$) |

**Nota:** As estruturas e os modos de ação destas coenzimas estão descritos na Parte II.

descobertas, os bioquímicos, por meio de um acordo internacional, adotaram um sistema de nomenclatura e classificação de enzimas. Esse sistema divide as enzimas em seis classes, cada uma com subclasses, com base nos tipos de reações que catalisam (Tabela 6-3). Um número de classificação de quatro partes e um nome sistemático, que identifica a reação catalisada, são especificados para cada enzima. Como exemplo, o nome sistemático da enzima que catalisa a reação

$$\text{ATP} + \text{D-glicose} \rightarrow \text{ADP} + \text{D-glicose-6-fosfato}$$

é ATP: glicose-fosfotransferase, indicando que ela catalisa a transferência de um grupo fosforribosil do ATP para a glicose. Seu número da Comissão de Enzimas (número E. C., do inglês ***E****nzyme* ***C****ommission*) é 2.7.1.1. O primeiro número (2) indica o nome da classe (transferase); o segundo número (7), a subclasse (fosfotransferase); o terceiro número (1), uma fosfotransferase que tem um grupo hidroxila como aceptor, e o quarto número (1), D-glicose como o aceptor do grupo fosforil. Para muitas enzimas, é usado um nome comum com mais frequência, hexocinase, nesse caso específico. Uma lista completa com a descrição dos milhares de enzimas conhecidas é mantida pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme). Este capítulo dedica-se principalmente aos princípios e às propriedades comuns a todas as enzimas.

### RESUMO 6.1 Introdução às enzimas

- A vida depende de catalisadores poderosos e específicos: as enzimas. Praticamente todas as reações bioquímicas são catalisadas por enzimas.
- Com a exceção de poucos RNA catalíticos, todas as enzimas conhecidas são proteínas. Muitas necessitam de coenzimas ou cofatores não proteicos para exercerem a atividade catalítica.
- As enzimas são classificadas segundo o tipo de reação que catalisam. Todas as enzimas têm número E. C. e nome formais. Muitas têm nomes comuns.

## 6.2 Como as enzimas funcionam

A catálise enzimática das reações é essencial para os sistemas vivos. Nas condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a ser lentas – a maioria das moléculas biológicas é muito estável nas condições internas das células com pH neutro, temperaturas amenas e ambiente aquoso. Além disso, muitos processos químicos corriqueiros, como a formação transitória de intermediários instáveis

**TABELA 6-3** Classificação internacional das enzimas

| Classe nº | Nome da classe | Tipo de reação catalisada |
|---|---|---|
| 1 | Oxidorredutases | Transferência de elétrons (íons hidrido ou átomos de H) |
| 2 | Transferases | Reações de transferência de grupos |
| 3 | Hidrolases | Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água) |
| 4 | Liases | Clivagem de C—C, C—O, C—N ou outras ligações por eliminação, rompimento de ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas. |
| 5 | Isomerases | Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas |
| 6 | Ligases | Formação de ligações C—C, C—S, C—O e C—N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares |

carregados ou a colisão de duas ou mais moléculas exatamente na orientação exata necessária para que as reações ocorram, são desfavoráveis ou improváveis no ambiente celular. As reações necessárias para digerir os alimentos, enviar sinais nervosos ou contrair os músculos simplesmente não ocorrem em velocidades adequadas sem catálise.

As enzimas contornam esses problemas ao proporcionarem um ambiente específico adequado para que uma dada reação possa ocorrer mais rapidamente. A propriedade característica das reações catalisadas por enzimas é que a reação ocorre confinada em um bolsão da enzima denominado **sítio ativo** (**Figura 6-1**). A molécula que liga no sítio ativo e sobre a qual a enzima age é denominada **substrato**. O contorno da superfície do sítio ativo é delimitado por resíduos de aminoácidos com grupos nas cadeias laterais que ligam o substrato e que catalisam a sua transformação química. Frequentemente, o sítio ativo engloba o substrato, sequestrando-o completamente da solução. O complexo enzima-substrato, cuja existência foi primeiramente proposta por Charles-Adolphe Wurtz em 1880, é fundamental para a ação enzimática. Também é o ponto de partida para o tratamento matemático que define o comportamento cinético das reações catalisadas por enzimas e para a descrição teórica dos mecanismos das enzimas.

## As enzimas alteram a velocidade da reação, não o equilíbrio

Uma reação enzimática simples pode ser escrita como

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E + P \qquad (6\text{-}1)$$

onde E, S e P representam enzima, substrato e produto; ES e EP são complexos transitórios da enzima com o substrato e com o produto.

Para entender a catálise, deve-se primeiro avaliar a importância de distinguir entre o equilíbrio e a velocidade de uma reação. A função do catalisador é aumentar a *velocidade* da reação. A catálise não afeta o *equilíbrio* da reação. Qualquer reação, como $S \rightleftharpoons P$, pode ser descrita por um diagrama de coordenadas da reação (**Figura 6-2**), que representa a variação de energia durante a reação. A energia é descrita nos sistemas biológicos, como foi discutido no Capítulo 1, em termos de energia livre, $G$. No diagrama de coordenadas da reação, a energia livre do sistema é colocada no gráfico em função do progresso da reação (a coordenada da reação). O ponto de partida tanto da reação direta quanto da reação reversa é denominado **estado fundamental**, a contribuição que uma molécula média (S ou P) fornece para a energia livre do sistema, sob dadas condições do sistema.

**CONVENÇÃO-CHAVE:** Para descrever a variação de energia livre das reações, químicos definiram um conjunto de condições padrão (temperatura de 298 K; pressão parcial de cada gás de 1 atm [ou 101,3 kPa]; concentração de cada soluto de 1 M) e expressam as mudanças de energia livre de um sistema reagindo sob essas condições como $\Delta G°$, a **variação de energia livre padrão**. Uma vez que os sistemas bioquímicos geralmente envolvem concentrações de $H^+$ muito abaixo de 1 M, bioquímicos definiram uma **variação de energia livre padrão bioquímica**, $\Delta G'°$, a variação de energia livre padrão *em pH 7,0*. Essa definição será usada neste livro. Uma definição mais completa de $\Delta G'°$ é fornecida no Capítulo 13. ■

O equilíbrio entre S e P reflete a diferença entre as energias livres dos seus estados fundamentais. No exemplo mostrado na Figura 6-2, a energia livre do estado fundamental de P é menor do que a de S, e então $\Delta G'°$ para a reação é negativa (reação exergônica) e o equilíbrio favorece mais P que S. A posição e a direção do equilíbrio *não* são afetadas pelos catalisadores.

Um equilíbrio favorável não significa que a conversão $S \rightarrow P$ ocorra em uma velocidade detectável. A *velocidade* da reação depende de um parâmetro totalmente diferente. Há uma barreira energética entre S e P: a energia necessária para alinhar os grupos reagentes, para a

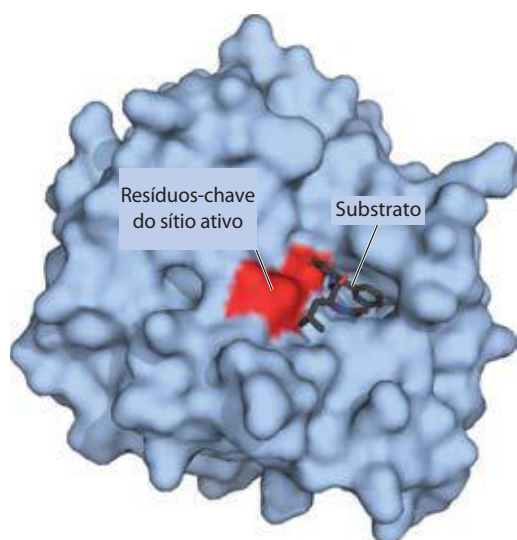



**FIGURA 6-1 Ligação de um substrato no sítio ativo de uma enzima.** A enzima quimotripsina, com o substrato ligado (PBD ID 7GCH). Alguns dos resíduos-chave do sítio ativo aparecem como uma mancha vermelha na superfície da enzima.

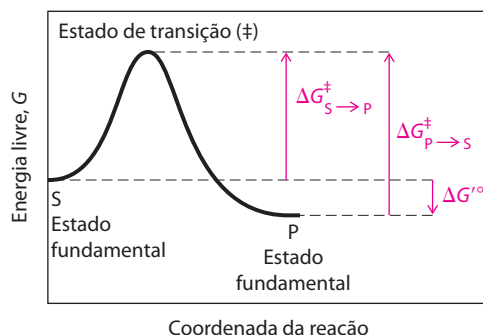



**FIGURA 6-2 Diagrama da coordenada da reação.** A energia livre do sistema está colocada no gráfico *versus* o progresso da reação $S \rightarrow P$. Diagramas deste tipo descrevem as mudanças de energia durante a reação. O eixo horizontal (coordenada da reação) reflete as mudanças químicas progressivas (p. ex., quebra ou formação da ligação) à medida que S é convertido em P. As energias de ativação, $\Delta G^‡$, para as reações $S \rightarrow P$ e $P \rightarrow S$ estão indicadas. $\Delta G'°$ é a variação total da energia livre padrão na direção $S \rightarrow P$.

formação de cargas instáveis transitórias, rearranjos de ligações e ainda outras transformações necessárias para que a reação ocorra em qualquer direção. Isso é ilustrado pela curva de energia nas Figuras 6-2 e 6-3. Para que a reação ocorra, as moléculas devem suplantar essa barreira e atingir um nível de energia mais alto. O topo da curva de energia é um ponto a partir do qual o decaimento para o estado S ou para o estado P tem a mesma probabilidade de ocorrer (nos dois casos a curva é descendente). Isso é denominado **estado de transição**. O estado de transição não é uma forma química com alguma estabilidade significativa e não deve ser confundido com os intermediários da reação (como ES ou EP). O estado de transição é um momento molecular transitório em que eventos como a quebra de ligação, a formação de ligação ou o desenvolvimento de carga ocorrem com a mesma probabilidade de seguirem tanto para formar novamente o substrato como para formar o produto. A diferença entre os níveis energéticos do estado basal e do estado de transição é a **energia de ativação**, $\Delta G^{\ddagger}$. A velocidade da reação reflete essa energia de ativação: uma energia de ativação maior corresponde a uma reação mais lenta. A velocidade da reação pode aumentar pela elevação da temperatura e/ou da pressão, o que aumenta o número de moléculas com energia suficiente para suplantar a barreira energética. Alternativamente, a energia de ativação pode ser diminuída pela adição de um catalisador (**Figura 6-3**). *Os catalisadores aumentam a velocidade das reações por diminuírem as energias de ativação.*

As enzimas não são exceções à regra de que os catalisadores não afetam o equilíbrio da reação. As flechas bidirecionais na Equação 6-1 indicam isso: qualquer enzima que catalise a reação S → P também catalisa a reação P → S. O papel da enzima é *acelerar* a interconversão entre S e P. A enzima não é gasta no processo e o ponto de equilíbrio não é afetado. Entretanto, a reação atinge o equilíbrio muito mais rapidamente quando a enzima apropriada estiver presente, pois a velocidade da reação é aumentada.

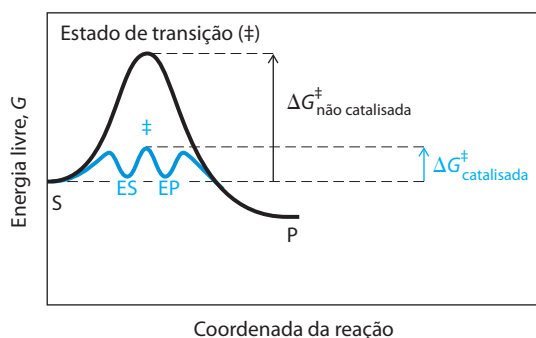
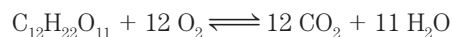



**FIGURA 6-3 Diagrama da coordenada da reação comparando uma reação catalisada por enzima com uma não catalisada.** Na reação S → P, os intermediários ES e EP ocupam o nível mínimo na curva da progressão da energia de uma reação catalisada por uma enzima. Os termos $\Delta G^{\ddagger}_{\text{não catalisada}}$ e $\Delta G^{\ddagger}_{\text{catalisada}}$ correspondem, respectivamente, à energia de ativação da reação não catalisada e à energia de ativação total da reação catalisada. A energia de ativação é menor quando a reação é catalisada por uma enzima.

Esse princípio geral é ilustrado pela conversão de sacarose e oxigênio em dióxido de carbono e água:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + 12\ O_2 \rightleftharpoons 12\ CO_2 + 11\ H_2O$$

Essa conversão, que ocorre por meio de uma série de reações separadas, tem $\Delta G'^{\circ}$ muito grande e negativo, e, no equilíbrio, a quantidade de sacarose presente é desprezível. Ainda assim, a sacarose é um composto estável, porque a barreira da energia de ativação que deve ser suplantada antes que reaja com oxigênio é bastante alta. A sacarose pode ser armazenada em um recipiente com oxigênio quase que indefinidamente sem reagir com ele. Nas células, entretanto, a sacarose é prontamente degradada em $CO_2$ e $H_2O$ em uma série de reações catalisadas por enzimas. Essas enzimas não apenas aceleram as reações, mas também as organizam e as controlam de modo que boa parte da energia liberada é recuperada em outras formas químicas, sendo disponibilizada para as células realizarem outras tarefas. A via de reações na qual a sacarose (e outros açúcares) é degradada constituiu a via primária de produção de energia das células. As enzimas dessa via permitem que a sequência de reações ocorra em uma escala de tempo biologicamente útil.

As reações podem ter várias etapas, incluindo a formação e o consumo de espécies químicas transitórias denominadas **intermediários da reação**.[1] Qualquer espécie da rota da reação que tenha uma vida química finita (maior do que a vibração molecular, $\sim 10^{-13}$ segundos) é um intermediário da reação. Quando a reação S $\rightleftharpoons$ P é catalisada por uma enzima, os complexos ES e EP podem ser considerados intermediários, mesmo que S e P sejam espécies químicas estáveis (Equação 6-1); os complexos ES e EP ocupam vales no diagrama das coordenadas da reação (Figura 6-3). Além disso, no curso de uma reação catalisada por enzima geralmente existem intermediários químicos menos estáveis. A interconversão entre dois intermediários da reação que ocorrem em sequência constitui uma etapa da reação. Quando uma reação tem várias etapas, a velocidade final é determinada pela etapa (ou etapas) com a maior energia de ativação. Essa etapa é denominada **etapa limitante da velocidade**. Em um caso simples, a etapa limitante da velocidade é o ponto de maior energia no diagrama da interconversão entre S e P. Na prática, a etapa limitante da reação pode variar segundo as condições de reação, sendo que muitas enzimas podem ter várias etapas com energias de ativação similares, significando que todas essas etapas são parcialmente limitantes da velocidade.

A energia de ativação é uma barreira energética para as reações químicas. Essas barreiras são cruciais para a própria vida. A velocidade na qual uma molécula sofre uma determinada reação diminui à medida que a barreira da reação aumenta. Sem essas barreiras energéticas, as macro-

[1]Neste capítulo, *etapa* e *intermediário* referem-se às espécies químicas na via de uma única reação catalisada por uma enzima. No contexto de vias metabólicas envolvendo muitas enzimas (discutido na Parte II), esses termos são usados de maneira diferente. Uma reação enzimática inteira geralmente é tomada como uma "etapa" da via, e o produto de uma reação enzimática (que é o substrato para a próxima enzima da via) é referido como "intermediário".

moléculas complexas poderiam reverter espontaneamente para formas moleculares mais simples, e as estruturas complexas e altamente ordenadas e os processos metabólicos das células não poderiam existir. Durante o curso da evolução, as enzimas desenvolveram-se para diminuir *seletivamente* as energias de ativação das reações necessárias para a sobrevivência celular.

## A velocidade e o equilíbrio da reação têm definições termodinâmicas precisas

O *equilíbrio* da reação está inexoravelmente ligado à variação da energia livre padrão da reação, $\Delta G'^\circ$ e a *velocidade* da reação está ligada à energia de ativação, $\Delta G^\ddagger$. Uma introdução básica sobre essas relações termodinâmicas é a próxima etapa para compreender como as enzimas agem.

Um equilíbrio como $S \rightleftharpoons P$ é descrito por uma **constante de equilíbrio**, $\boldsymbol{K_{eq}}$, ou simplesmente $K$ (p. 25). Nas condições padrão usadas para comparar os processos bioquímicos, a constante de equilíbrio é designada $K'_{eq}$ (ou $K'$):

$$K'_{eq} = \frac{[P]}{[S]} \tag{6-2}$$

Segundo a termodinâmica, a relação entre $K'_{eq}$ e $\Delta G'^\circ$ pode ser descrita pela expressão

$$\Delta G'^\circ = -RT \ln K'_{eq} \tag{6-3}$$

onde $R$ é a constante dos gases, 8,315 J/mol · K, e $T$ é a temperatura absoluta, 298 K (25°C). A Equação 6-3 é desenvolvida e discutida com mais detalhes no Capítulo 13. Aqui, o ponto importante é que a constante de equilíbrio é diretamente relacionada com o total da energia livre padrão da reação (Tabela 6-4). Um grande valor negativo de $\Delta G'^\circ$ reflete um equilíbrio de reação favorável, mas, como foi observado, isso não significa que a reação ocorrerá com velocidade alta.

A velocidade de uma reação é determinada pela concentração do reagente (ou reagentes) e por uma **constante de velocidade**, normalmente designada por $k$. Para uma reação unimolecular $S \rightarrow P$, a velocidade da reação, $V$ (representando a quantidade de S que reage por unidade de tempo), é expressa por uma **equação de velocidade**:

$$V = k[S] \tag{6-4}$$

Nessa reação, a velocidade depende apenas da concentração de S, sendo uma reação de primeira ordem. O fator $k$ é uma constante de proporcionalidade que reflete a probabilidade de que a reação ocorra em determinado conjunto de condições (pH, temperatura, etc.). Aqui, $k$ é a constante de velocidade de primeira ordem e tem como unidade a recíproca do tempo, como $s^{-1}$. Se uma reação de primeira ordem tiver uma constante de velocidade $k$ de 0,03 $s^{-1}$, isso pode ser interpretado (quantitativamente) como que 3% do S disponível serão convertidos em P em 1 s. Uma reação com uma constante de velocidade de 2.000 $s^{-1}$ ocorrerá em uma pequena fração de segundo. Se a velocidade de reação depender da concentração de dois compostos diferentes, ou se a reação for entre duas moléculas de um mesmo composto, a reação será de segunda ordem, e $k$ é a constante de velocidade de segunda ordem, com unidade de $M^{-1}s^{-1}$. A equação da velocidade passa a ser

$$V = k[S_1][S_2] \tag{6-5}$$

A partir da teoria do estado de transição pode-se derivar uma expressão relacionando a magnitude da constante de velocidade com a energia de ativação:

$$k = \frac{\mathbf{k}T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger/RT} \tag{6-6}$$

onde $\mathbf{k}$ é a constante de Boltzmann e $h$ é a constante de Planck. Nesse momento, o ponto importante é que a relação entre a constante de velocidade $k$ e a energia de ativação $\Delta G^\ddagger$ é inversa e exponencial. De maneira simples, essa é a base para afirmar que energia de ativação mais baixa significa velocidade de reação mais rápida.

Depois de analisar *o que* as enzimas fazem, é possível focalizar *como* elas o fazem.

**TABELA 6-4** Relações entre $K'_{eq}$ e $\Delta G'^\circ$

| $K'_{eq}$ | $\Delta G'^\circ$ (kJ/mol) |
|---|---|
| $10^{-6}$ | 34,2 |
| $10^{-5}$ | 28,5 |
| $10^{-4}$ | 22,8 |
| $10^{-3}$ | 17,1 |
| $10^{-2}$ | 11,4 |
| $10^{-1}$ | 5,7 |
| 1 | 0 |
| $10^{1}$ | –5,7 |
| $10^{2}$ | –11,4 |
| $10^{3}$ | –17,1 |

**Nota:** Esta relação é calculada a partir de $\Delta G'^\circ = -RT \ln K'_{eq}$ (Equação 6-3).

## Poucos princípios são suficientes para explicar o poder catalítico e a especificidade das enzimas

As enzimas são catalisadores extraordinários. O aumento de velocidade conferido pelas enzimas situa-se na faixa de 5 a 17 ordens de magnitude (Tabela 6-5). As enzimas também são muito específicas, distinguindo facilmente substratos com estruturas muito semelhantes. Como é que esse enorme e altamente seletivo aumento de velocidade pode ser explicado? Qual é a fonte de energia para essa grande diminuição nas energias de ativação de reações específicas?

A resposta para essas questões tem duas partes distintas, embora interligadas. A primeira parte baseia-se no rearranjo de ligações covalentes durante a reação catalisada pela enzima. Muitos tipos de reações químicas ocorrem entre substratos e grupos funcionais da enzima (cadeias específicas de aminoácidos, íons metálicos e coenzimas). Grupos funcionais catalíticos na enzima podem formar ligações covalentes transitórias com um substrato e ativá-lo para a reação, ou um grupo pode ser transitoriamente transferido do substrato para a enzima. Geralmente, essas reações

**TABELA 6-5** Alguns aumentos de velocidade proporcionados por enzimas

| | |
|---|---|
| Ciclofilina | $10^5$ |
| Anidrase carbônica | $10^7$ |
| Triose-fosfato-isomerase | $10^9$ |
| Carboxipeptidase A | $10^{11}$ |
| Fosfoglicomutase | $10^{12}$ |
| Succinil-CoA-transferase | $10^{13}$ |
| Urease | $10^{14}$ |
| Orotidina-monofosfato-descarboxilase | $10^{17}$ |

ocorrem apenas no sítio ativo da enzima. Interações covalentes entre enzimas e substratos diminuem a energia de ativação, acelerando a reação, por fornecerem condições para que a reação ocorra por uma via alternativa de baixa energia. Os tipos específicos de rearranjos que ocorrem estão descritos na Seção 6.4.

A segunda parte da explicação fundamenta-se em interações *não covalentes* entre enzima e substrato. É importante lembrar (Capítulo 4) que interações fracas não covalentes ajudam a estabilizar a estrutura das proteínas e as interações proteína-proteína. Essas mesmas interações são cruciais para a formação de complexos entre proteínas e moléculas pequenas, incluindo os substratos de enzimas. Muito da energia necessária para diminuir a energia de ativação provém de interações fracas não covalentes entre substrato e enzima. O que realmente distingue as enzimas de outros catalisadores é a formação de um complexo ES específico. A interação entre substrato e enzima nesse complexo é mediada pelas mesmas forças que estabilizam a estrutura das proteínas, incluindo ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas e iônicas (Capítulo 4). A formação de cada interação fraca no complexo ES é acompanhada pela liberação de uma pequena quantidade de energia livre que estabiliza a interação. A energia proveniente da interação enzima-substrato é denominada **energia de ligação**, $\Delta G_B$. O seu significado abrange mais que uma simples interação enzima-substrato. *A energia de ligação é a principal fonte de energia livre utilizada pelas enzimas para a diminuição da energia de ativação das reações*.

Dois princípios fundamentais inter-relacionados possibilitam uma explicação geral de como as enzimas utilizam a energia de ligação não covalente.

1. Muito do poder catalítico das enzimas provém basicamente da energia livre liberada na formação de muitas ligações fracas e interações entre a enzima e seu substrato. Essa energia de ligação contribui tanto para a especificidade como também para a catálise.
2. Interações fracas são otimizadas no estado de transição da reação. Os sítios ativos das enzimas são complementares não aos substratos por si mesmos, mas aos estados de transição pelos quais os substratos passam ao serem convertidos em produtos durante a reação enzimática.

Esses termos são essenciais para o entendimento das enzimas e constituem importante foco deste capítulo.

## As interações fracas entre enzima e substrato são otimizadas no estado de transição

Como é que as enzimas utilizam a energia de ligação para diminuírem a energia de ativação de uma reação? A formação do complexo ES não é, por si só, uma explicação, embora algumas das primeiras considerações sobre os mecanismos de ação das enzimas tenham começado com essa ideia. Estudos sobre a especificidade das enzimas, realizados por Emil Fischer, o levaram a propor, em 1894, que as enzimas seriam estruturalmente complementares aos seus substratos de modo a se encaixarem como uma chave em uma fechadura (**Figura 6-4**). Essa ideia elegante, de que uma interação específica (portanto, exclusiva) entre duas moléculas biológicas seria mediada por superfícies moleculares com formas complementares, influenciou muito o desenvolvimento da bioquímica; efetivamente, essas interações são centrais para muitos processos bioquímicos. Entretanto, a hipótese da "chave e fechadura" pode ser enganadora quan-

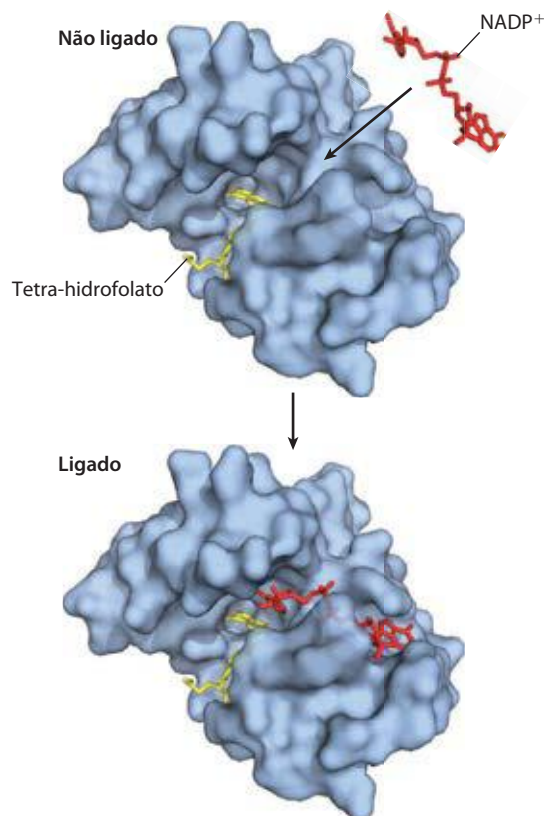



**FIGURA 6-4 Complementaridade de formas entre o substrato e o seu sítio de ligação na enzima.** A enzima di-hidrofolato-redutase com o seu substrato $NADP^+$ (em vermelho) não ligado (acima) e ligado (abaixo). O tetra-hidrofolato (em amarelo) também é visível (PDB 1D 1RA2). Neste modelo, o $NADP^+$ liga-se a um bolsão complementar à sua forma e às suas propriedades iônicas, ilustração da hipótese de "chave e fechadura" proposta por Emil Fischer para a ação enzimática. Na realidade, a complementaridade entre proteína e ligante (neste caso, o substrato) raramente é perfeita, como visto no Capítulo 5.

do aplicada à catálise enzimática. Uma enzima totalmente complementar ao seu substrato seria uma enzima muito pobre, como se pode demonstrar.

Por exemplo, considere uma reação imaginária, a quebra de um bastão de metal magnetizado; a reação não catalisada está mostrada na **Figura 6-5a**. Duas enzimas imaginárias – duas "bastonases" – poderiam catalisar essa reação. Ambas utilizam forças magnéticas como paradigma para a energia de ligação utilizada por enzimas reais. Primeiro, será desenhada uma enzima perfeitamente complementar ao substrato (Figura 6-5b). O sítio ativo dessa bastonase é um bolsão delimitado por ímãs. Para reagir (quebrar), o bastão deve atingir o estado de transição da reação, mas o bastão se encaixa tão perfeitamente ao sítio ativo que não consegue se dobrar, pois ao se dobrar haveria a eliminação de algumas das interações magnéticas entre o bastão e a enzima. Uma enzima desse tipo *impede* a reação, porque estabiliza o substrato em vez de desestabilizá-lo. No diagrama de coordenadas da reação (Figura 6-5b), esse tipo de complexo ES corresponderia a uma energia da qual o substrato teria dificuldade de escapar. Uma enzima dessas seria inútil.

A noção moderna da catálise enzimática, primeiramente proposta por Michael Polanyi (1921) e Haldane (1930), foi elaborada por Linus Pauling em 1946 e por William P. Jencks na década de 1970. Para poder catalisar reações, as enzimas devem ser complementares ao *estado de transição da reação*. Isso significa que interações ótimas entre substratos e enzimas só ocorrem no estado de transição. A Figura 6-5c demonstra como uma enzima dessas pode funcionar. O bastão de metal liga-se à bastonase, mas apenas um subconjunto das interações mag-

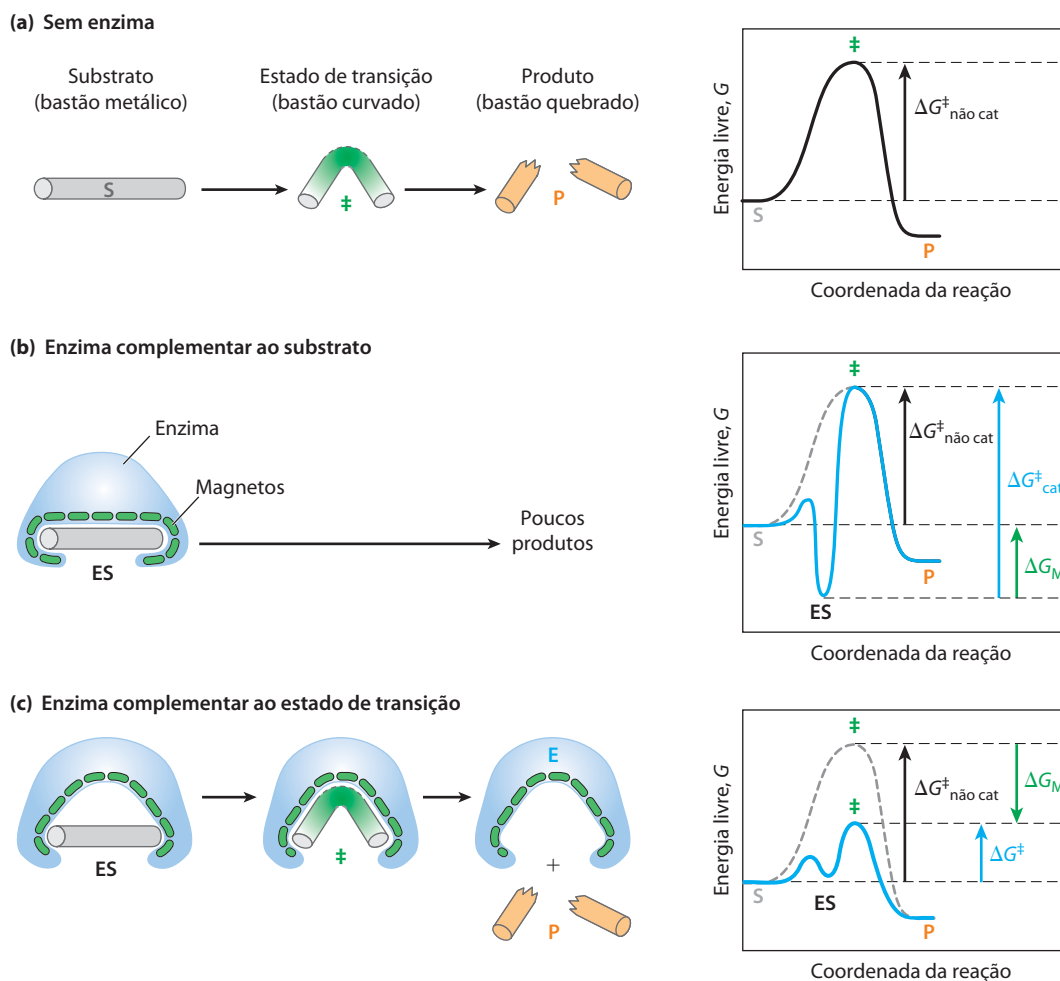



**FIGURA 6-5 Proposta de uma enzima imaginária (bastonase) que catalise a quebra de um bastão metálico. (a)** Antes da quebra, o bastão primeiro deve ser curvado (o estado de transição). Nos dois exemplos de bastonase, interações magnéticas representam as ligações fracas entre a enzima e o substrato. **(b)** A bastonase com um bolsão magnético de estrutura complementar a do bastão (o substrato) estabiliza o substrato. O curvamento é impedido pelas atrações magnéticas entre o bastão e a bastonase. **(c)** Uma enzima com bolsão complementar ao estado de transição da reação ajuda a desestabilizar o bastão, contribuindo para a catálise da reação. A energia de ligação das interações magnéticas compensa o aumento da energia livre necessária para curvar o bastão. Os diagramas das coordenadas das reações (à direita) mostram as consequências energéticas da complementaridade ao substrato *versus* a complementaridade ao estado de transição (os complexos EP estão omitidos). $\Delta G_M$, a diferença entre as energias dos estados de transição da reação catalisada e da não catalisada, reflete a contribuição das interações magnéticas entre o bastão e a bastonase. Quando a enzima for complementar ao substrato **(b)**, o complexo ES é mais estável e tem menos energia livre no estado basal que o substrato isoladamente. O resultado é um *aumento* na energia de ativação.

néticas possíveis é usado para formar o complexo ES. O substrato ligado ainda deve ter aumento na energia livre para atingir o estado de transição. Agora, entretanto, o aumento de energia livre necessário para tensionar o bastão em uma curvatura e quebrar parcialmente a conformação é compensado ("pago") pelas interações (energia de ligação) que se formam entre a enzima e o substrato no estado de transição. Muitas dessas interações envolvem partes do bastão distantes do ponto de quebra. Assim, as interações entre a bastonase e as regiões não reagentes do bastão fornecem parte da energia necessária para catalisar a quebra do bastão. Esse "pagamento de energia" traduz-se em diminuição efetiva na energia de ativação e aumento na velocidade da reação.

As enzimas reais agem segundo um princípio análogo. No complexo ES há a formação de interações fracas, mas a completa complementaridade entre o substrato e a enzima ocorre apenas quando o substrato estiver no estado de transição. A energia livre (energia de ligação) liberada durante a formação dessas interações compensa parcialmente a energia necessária para atingir o topo da curva de energia. A soma da energia de ativação $\Delta G^{\ddagger}$ desfavorável (positiva) e a energia de ligação favorável $\Delta G_B$ (negativa) resulta em uma redução *líquida* da energia de ativação (**Figura 6-6**). Mesmo quando ligado à enzima, o estado de transição não é uma forma estável, mas sim o curto período de tempo em que o substrato permanece no topo da curva de energia. Reações catalisadas por enzimas são muito mais rápidas que os processos não catalisados, pois a barreira energética a ser vencida é muito menor. O princípio importante é que *interações com ligações fracas entre a enzima e o substrato fornecem uma substancial força propulsora para a catálise enzimática*. Os grupos presentes no substrato e envolvidos nessas ligações fracas podem atuar a alguma distância das ligações rompidas ou modificadas. As interações fracas formadas apenas no estado de transição são as que fazem a principal contribuição para a catálise.

A necessidade de múltiplas interações fracas para impelir a catálise ajuda a explicar por que as enzimas (e algumas coenzimas) são tão grandes. A enzima deve fornecer grupos funcionais para as interações iônicas, ligações de hidrogênio e outras interações importantes e também deve posicionar precisamente esses grupos de modo que a energia de ligação seja otimizada no estado de transição. A formação de uma ligação adequada é atingida mais facilmente pelo posicionamento do substrato em uma cavidade (o sítio ativo) onde é efetivamente removido da água. O tamanho das proteínas reflete a necessidade de uma superestrutura para manter os grupos interativos posicionados adequadamente e para evitar o colapso da cavidade.

**FIGURA 6-6 Papel da energia de ligação na catálise.** Para diminuir a energia de ativação da reação, o sistema deve adquirir uma quantidade de energia equivalente ao valor da diminuição de $\Delta G^{\ddagger}$. Boa parte dessa energia vem da energia de ligação ($\Delta G_B$) proporcionada pela formação de interações fracas não covalentes entre substrato e enzima que ocorrem no estado de transição. O papel de $\Delta G_B$ é análogo ao de $\Delta G_M$ da Figura 6-5.

## A energia de ligação contribui para a especificidade da reação e a catálise

É possível demonstrar quantitativamente que a energia de ligação é responsável pela enorme aceleração na velocidade proporcionada pelas enzimas? A resposta é sim. Como ponto de referência, a Equação 6-6 permite calcular que, nas condições normais das células, $\Delta G^{\ddagger}$ deve ser diminuído em cerca de 5,7 kJ/mol para acelerar uma reação de primeira ordem por um fator de 10. A energia que é disponibilizada pela formação de uma única interação fraca geralmente é estimada em 4 a 30 kJ/mol. A energia total disponibilizada por um certo número dessas interações é, portanto, suficiente para uma diminuição da energia de ativação entre os 60 e os 100 kJ/mol necessários para explicar o grande aumento na velocidade das reações observado em muitas enzimas.

A mesma energia de ligação que fornece energia para a catálise também dá às enzimas sua **especificidade**, isto é, a capacidade de distinguir entre substratos e moléculas competidoras. Conceitualmente, especificidade é fácil de distinguir de catálise, contudo, essa diferenciação é muito mais difícil de demonstrar experimentalmente, pois a catálise e a especificidade provêm do mesmo fenômeno. Se o sítio ativo de uma enzima tiver grupos funcionais organizados otimamente de modo que se forme uma grande variedade de interações fracas com determinado substrato no correspondente estado de transição, a enzima não será capaz de interagir com a mesma intensidade com alguma outra molécula. Por exemplo, se o substrato tiver um grupo hidroxila que forme uma ligação de hidrogênio com um resíduo específico de Glu de uma enzima, qualquer molécula que não tiver um grupo hidroxila naquela determinada posição será um substrato pobre para essa enzima. Ainda, qualquer molécula que tiver um grupo funcional extra para o qual a enzima não tenha um bolsão ou um sítio de ligação provavelmente será excluída da enzima. De maneira geral, a *especificidade* deriva da formação de muitas interações fracas entre a enzima e a molécula específica do substrato.

A importância da energia de ligação para a catálise pode ser facilmente demonstrada. Por exemplo, a enzima glicolítica triose-fosfato-isomerase catalisa a interconversão entre gliceraldeído-3-fosfato e di-hidroxiacetona-fosfato:

$$\underset{\text{Gliceraldeído-3-fosfato}}{\overset{1}{H}C{=}O - \overset{2}{H}C{-}OH - \overset{3}{C}H_2OPO_3^{2-}} \underset{\text{Triose-fosfato-isomerase}}{\rightleftharpoons} \underset{\text{Di-hidroxiacetonafosfato}}{H_2C{-}OH - C{=}O - CH_2OPO_3^{2-}}$$

Gliceraldeído-3-fosfato | Triose-fosfato-isomerase | Di-hidroxiacetonafosfato

Esta reação rearranja os grupos carbonila e hidroxila dos carbonos 1 e 2. Entretanto, mais de 80% da aceleração da velocidade da reação catalisada pela enzima foi relacionado com as interações enzima-substrato envolvendo o grupo fosfato do carbono 3 do substrato. Isso foi determinado comparando as reações catalisadas pela enzima usando como substratos gliceraldeído-3-fosfato e gliceraldeído (sem grupo fosfato na posição 3).

O princípio geral apresentado anteriormente pode ser ilustrado por vários mecanismos catalíticos bem conhecidos. Esses mecanismos não são mutuamente excludentes, de modo que uma mesma enzima pode incorporar vários tipos de mecanismos no seu mecanismo total de ação.

Considerando o que é necessário para a reação acontecer, verifica-se que fatores físicos e termodinâmicos preponderantes contribuem para $\Delta G^{\ddagger}$, a barreira para a reação. Entre esses mecanismos, é possível incluir (1) a entropia (liberdade de movimento) das moléculas em solução, que reduz a possibilidade de que elas reajam entre si; (2) a camada de solvatação das moléculas de água ligadas por ligações de hidrogênio e que rodeiam e ajudam a estabilizar a maioria das moléculas biológicas em solução aquosa; (3) a distorção dos substratos que ocorre em muitas reações; (4) a necessidade de um alinhamento apropriado dos grupos funcionais catalíticos da enzima. A energia de ligação pode ser usada para superar todas essas barreiras.

Primeiro, uma grande restrição à mobilidade relativa de dois substratos prestes a reagir, ou **redução da entropia**, é um benefício óbvio proporcionado pela ligação deles à enzima. A energia de ligação mantém o substrato na orientação apropriada para reagir, uma contribuição substancial para a catálise, porque colisões produtivas entre as moléculas da solução podem ser muito raras. Os substratos podem ser alinhados precisamente com a enzima com muitas interações fracas entre cada substrato e grupos estrategicamente posicionados na enzima fixando as moléculas de substrato na posição apropriada. Estudos mostraram que restrições à mobilidade de dois reagentes podem produzir um aumento de várias ordens de grandeza na velocidade (**Figura 6-7**).

Segundo, a formação de ligações fracas entre substrato e enzima resulta na **dessolvatação** do substrato. Interações enzima-substrato substituem a maioria das ligações de hidrogênio entre o substrato e as moléculas de água que são um impedimento para a reação. Terceiro, a energia de ligação envolvendo interações fracas, que se formam apenas no estado de transição da reação, ajudam a compensar termodinamicamente qualquer distorção, principalmente a redistribuição de elétrons, de modo que então o substrato pode sofrer a reação.

Finalmente, em geral a enzima também sofre uma mudança de conformação quando o substrato se liga a ela, induzindo múltiplas interações fracas com o substrato. Isso é chamado de **ajuste induzido**, mecanismo postulado por Daniel Koshland em 1958. Esses movimentos podem afetar apenas uma pequena parte da enzima nas proximidades do sítio ativo ou podem envolver mudanças no posicionamento de domínios inteiros da enzima. Em geral, uma rede de movimentos acoplados ocorre por toda a enzima, que finalmente leva às mudanças necessárias no sítio ativo. O ajuste induzido serve para levar grupos funcionais específicos da enzima para uma posição apropriada para catalisar a reação. As mudanças conformacionais também permitem a formação de ligações fracas adicionais no estado de transição. Em ambos os casos, a nova conformação da enzima apresenta propriedades catalíticas aumentadas. Como foi visto, o ajuste induzido é uma característica comum da interação reversível de ligantes com proteínas (Capítulo 5). O ajuste induzido também é importante para a interação de praticamente todas as enzimas com seus substratos.

**FIGURA 6-7 Aumento da velocidade por redução da entropia.** A figura mostra reações de ésteres com grupos carboxilatos formando anidridos. Em todos os casos, o grupo R é o mesmo. **(a)** Nesta reação bimolecular, a constante *k* é de segunda ordem, com unidades de $M^{-1}s^{-1}$. **(b)** Quando os dois grupos reagentes estão em uma mesma molécula, e então têm menor liberdade de movimento, a reação é muito mais rápida. Nesta reação unimolecular, *k* tem unidade de $s^{-1}$. Dividindo a constante de velocidade de (b) pela constante de velocidade de (a) obtém-se um fator de aumento de velocidade de $10^5$ M. (O aumento de velocidade tem como unidade a molaridade, pois neste caso uma reação unimolecular foi comparada com uma reação bimolecular.) Colocando de outra maneira, se o reagente em (b) estiver em uma concentração de 1 M, o *comportamento* dos grupos reativos será o mesmo que teria caso estivesse em uma concentração de $10^5$ M. Observe que a reação em (b) tem liberdade de rotação em três de suas ligações (mostradas por meio de setas curvas), mas, mesmo assim, isso representa uma redução substancial de entropia em relação a (a). Se as rotações das ligações que giram em (b) forem tolhidas como em (c), a entropia é reduzida ainda mais e a reação apresenta um aumento de velocidade de $10^8$ M em relação a (a).

## Grupos catalíticos específicos contribuem para a catálise

Em muitas enzimas, a energia de ligação utilizada para formar o complexo ES é apenas um dos vários contribuintes para o mecanismo total de catálise. Uma vez que o substrato esteja ligado a uma enzima, grupos funcionais catalíticos posicionados de modo apropriado ajudam no rompimento e na formação de ligações por vários mecanismos,

incluindo catálise geral acidobásica, catálise covalente e catálise por íons metálicos. Esses mecanismos são diferentes dos mecanismos com base na energia de ligação, pois geralmente envolvem uma interação transitória *covalente* com o substrato ou a transferência de um grupo do substrato ou para ele.

**Catálise geral acidobásica.** A transferência de prótons é a reação mais comum em bioquímica. No curso da maioria das reações que ocorrem nas células há transferência de um ou, geralmente, de muitos prótons. Muitas reações bioquímicas envolvem a formação de intermediários carregados instáveis que tendem a quebrarem-se rapidamente nas espécies reagentes que os constituem, impossibilitando assim a reação (**Figura 6-8**). Intermediários carregados, geralmente, podem ser estabilizados pela transferência de prótons para os substratos (ou dos substratos) ou intermediários formando uma espécie que se transforma mais rapidamente em produtos. O efeito da catálise por ácidos ou bases é geralmente estudado usando reações não enzimáticas como modelo. Nessas reações não enzimáticas, a transferência de prótons pode envolver apenas constituintes da água ou então de outros doadores ou aceptores fracos de próton. Catalisadores que utilizam apenas íons $H^+$ ($H_3O^+$) ou $OH^-$ presentes na água são chamados de **catalisadores acidobásicos**. Se prótons forem transferidos entre o intermediário e a água mais rapidamente do que a quebra do intermediário em reagentes, o intermediário é estabilizado cada vez que se formar e nenhuma catálise adicional mediada por outros aceptores ou doadores de prótons ocorrerá. Em muitos casos, entretanto, apenas água é insuficiente. O termo **catálise geral acidobásica** refere-se à transferência de prótons mediada por alguma outra molécula que não água. Nas reações não catalisadas por enzimas que ocorrem em soluções aquosas, a adição de ácidos ou bases fortes proporciona uma aceleração da velocidade observável somente se o intermediário instável da reação quebrar-se em reagentes com mais rapidez do que a transferência de prótons apenas da água (ou transferência de prótons para formar água). Nessa situação, muitos ácidos orgânicos fracos podem suplementar a água como doadores de prótons, ou então bases orgânicas fracas podem servir como aceptores de prótons.

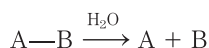
No sítio ativo das enzimas, onde moléculas de água talvez não estejam disponíveis como doadoras ou aceptoras de prótons, a catálise acidobásica geral torna-se crucial. Algumas cadeias laterais de aminoácidos podem assumir o papel de agentes doadores e aceptores de prótons (**Figura 6-9**). Esses grupos podem estar posicionados precisamente no sítio ativo da enzima de modo a possibilitar a transferência de prótons, proporcionando um aumento de velocidade da ordem de $10^2$ a $10^5$. Esse tipo de catálise ocorre na grande maioria das enzimas.

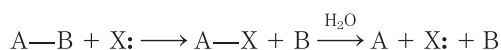
**FIGURA 6-8 Como o catalisador contorna o incremento de cargas desfavoráveis durante a hidrólise de uma amida.** A hidrólise da ligação amida, mostrada aqui, é a mesma reação catalisada pela quimotripsina e outras proteases. O incremento de cargas é desfavorável e pode ser contornado pela doação de um próton por parte de $H_3O^+$ (catálise ácida específica) ou HA (catálise ácida geral), sendo que HA representa qualquer ácido. De maneira semelhante, a carga pode ser neutralizada pela subtração de um $OH^-$ (catálise básica específica) ou de B**:** (catálise básica geral), na qual B**:** representa uma base qualquer.

| Resíduo de aminoácido | Forma geral ácida (doador de próton) | Forma geral básica (aceptor de próton) |
|---|---|---|
| Glu, Asp | R—COOH | R—COO⁻ |
| Lys, Arg | R—$\overset{+}{N}H_3$ | R—$\ddot{N}H_2$ |
| Cys | R—SH | R—S⁻ |
| His | R—C═CH, HN, $\overset{+}{N}H$, C—H (anel imidazol protonado) | R—C═CH, HN, N**:**, C—H (anel imidazol) |
| Ser | R—OH | R—O⁻ |
| Tyr | R—C₆H₄—OH | R—C₆H₄—O⁻ |

**FIGURA 6-9 Aminoácidos na catálise geral acidobásica.** Muitas reações orgânicas são favorecidas por doadores (ácidos gerais) ou aceptores (bases gerais) de prótons. Os sítios ativos de algumas enzimas têm grupos funcionais de aminoácidos, como os mostrados aqui, que podem participar dos processos catalíticos como doadores ou aceptores de prótons.

**Catálise covalente.** Na catálise covalente há a formação de uma ligação covalente transitória entre a enzima e o substrato. Considere a hidrólise de uma ligação entre os grupos A e B:

$$\text{A—B} \xrightarrow{H_2O} \text{A} + \text{B}$$

Na presença de um catalisador covalente (enzima com grupo nucleofílico X**:**), a reação torna-se

$$\text{A—B} + \text{X:} \longrightarrow \text{A—X} + \text{B} \xrightarrow{H_2O} \text{A} + \text{X:} + \text{B}$$

Isso modifica o caminho da reação e resulta em catálise *apenas* quando o novo caminho tiver uma energia de ativação menor do que a da reação não catalisada. Ambas as novas etapas devem ser mais rápidas do que a reação não catalisada. Várias cadeias laterais de aminoácidos, incluindo as mostradas na Figura 6-9, e grupos funcionais de alguns cofatores de enzimas servem como agentes nucleofílicos na formação de ligações covalentes com substratos. Esses complexos covalentes sempre passam por uma reação adicional para regenerar a enzima livre. A ligação covalente entre enzima e substrato pode ativar o substrato para uma reação posterior de um modo geralmente específico para um grupo ou uma coenzima.

**Catálise por íons metálicos.** Metais, tanto ligados firmemente à enzima quanto tomados da solução juntamente com o substrato, podem participar na catálise de várias maneiras. Interações iônicas entre metais ligados a enzimas e substratos podem ajudar a orientar o substrato para a reação ou estabilizar estados de transição carregados. Esse tipo de uso de interações fracas entre metais e substratos é similar a alguns dos usos da energia de ligação enzima-substrato descritos anteriormente. Os metais também podem ser mediadores de reações de oxidorredução por mudanças reversíveis no estado de oxidação do íon metálico. Aproximadamente um terço de todas as enzimas conhecidas necessita de um ou mais íons metálicos para a atividade catalítica.

A maioria das enzimas combina várias estratégias de catálise para proporcionar um aumento na velocidade das reações. Um bom exemplo é o uso de catálise covalente, catálise geral acidobásica e estabilização do estado de transição na reação catalisada pela quimotripsina, apresentada em detalhes na Seção 6.4.

### RESUMO 6.2 Como as enzimas funcionam

- As enzimas são catalisadores altamente eficazes, geralmente aumentando as velocidades de reação por um fator de $10^5$ a $10^{17}$.
- As reações catalisadas por enzimas são caracterizadas pela formação de um complexo entre o substrato e a enzima (complexo ES). A ligação ao substrato ocorre em um bolsão da enzima denominado sítio ativo.
- A função das enzimas e dos outros catalisadores é diminuir a energia de ativação, $\Delta G^{\ddagger}$, da reação, aumentando, assim, a velocidade das reações. O equilíbrio da reação não é afetado pela enzima.
- Uma parte significativa da energia utilizada no aumento da velocidade das reações proporcionada por enzimas provém de interações fracas (ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas e iônicas) entre substrato e enzima. O sítio ativo das enzimas é estruturado de modo tal que algumas dessas ligações fracas ocorrem preferencialmente no estado de transição, estabilizando esse estado. A necessidade de interações múltiplas é uma das razões para o grande tamanho das enzimas. A energia de ligação, $\Delta G_B$, é usada de diversas maneiras para diminuir a energia necessária para a ativação, $\Delta G^{\ddagger}$. Ela pode ser usada, por exemplo, para diminuir a entropia, para a dessolvatação do substrato ou para provocar uma mudança conformacional na enzima (ajuste induzido). A energia de ligação também é responsável pela extraordinária especificidade das enzimas por seus substratos.
- Mecanismos catalíticos adicionais utilizados pelas enzimas incluem a catálise geral acidobásica, a catálise covalente e a catálise por íons metálicos. A catálise geralmente envolve interações covalentes transitórias entre o substrato e a enzima, ou a transferência de grupo da enzima ou para a enzima, de modo a proporcionar um caminho novo e com menor energia de ativação para as reações. Em qualquer dos casos, as enzimas retornam ao estado não ligado uma vez que a reação tenha se completado.

## 6.3 A cinética enzimática como abordagem à compreensão do mecanismo

Normalmente os bioquímicos utilizam várias abordagens para estudar o mecanismo de ação de enzimas purificadas. A estrutura tridimensional das proteínas fornece informações importantes, que são incrementadas pela química de proteínas e por modernos métodos de mutagênese sítio-dirigida (mudança na sequência de aminoácidos de uma proteína por engenharia genética; ver Figura 9-10). Essas tecnologias permitem que os enzimologistas examinem o papel de aminoácidos individualmente na estrutura e na atividade de uma enzima. Entretanto, a abordagem mais antiga para entender o mecanismo das enzimas, e que permanece ainda entre as mais importantes, é determinar a *velocidade* da reação e como ela se modifica em resposta a mudanças nos parâmetros experimentais, disciplina conhecida como **cinética enzimática**. A seguir, será apresentada uma breve introdução à cinética das reações catalisadas por enzimas. Visões mais avançadas estão disponíveis nas fontes citadas ao final deste capítulo.

### A concentração do substrato influi na velocidade das reações catalisadas por enzimas

Um fator-chave que afeta a velocidade das reações catalisadas por enzimas é a concentração do substrato, [S]. Entretanto, o estudo dos efeitos da concentração do substrato é complicado pelo fato de [S] modificar-se durante o curso de uma reação *in vitro* à medida que o substrato é convertido em produto. Uma abordagem que simplifica os experimentos de cinética enzimática é medir a **velocidade inicial**, designada como $V_0$ (**Figura 6-10**). Em uma

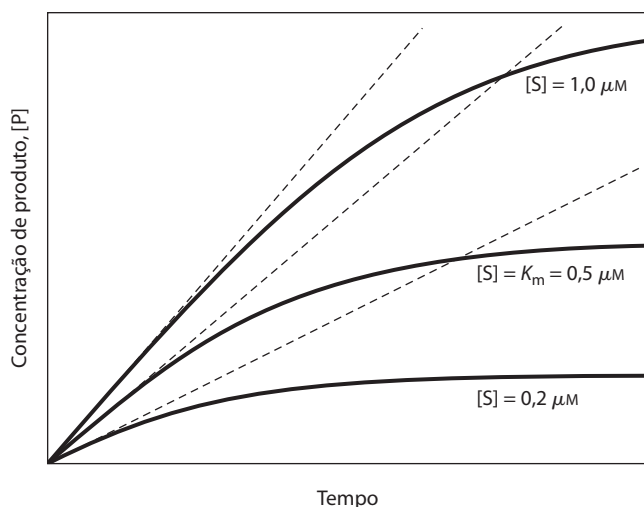



**FIGURA 6-10 Velocidades iniciais de reações catalisadas por enzimas.** Uma enzima teórica catalisa a reação S ⇌ P. A enzima está presente em uma concentração suficiente para catalisar a reação a uma velocidade máxima, $V_{máx}$, de 1 μM/min. A constante de Michaelis, $K_m$ (explicada no texto), é 0,5 μM. Estão mostradas as curvas de progressão da reação para as concentrações abaixo, exatamente no $K_m$ e acima dele. A velocidade de uma reação catalisada por uma enzima diminui à medida que o substrato é convertido em produto. A tangente de cada curva, no tempo zero, define a velocidade inicial, $V_0$, de cada uma das reações.

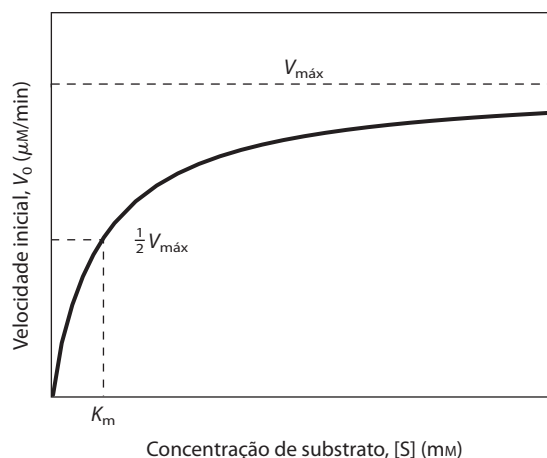



**FIGURA 6-11 Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima.** A velocidade máxima, $V_{máx}$, é extrapolada a partir de gráficos como este, pois a $V_0$ aproxima-se, mas nunca atinge a $V_{máx}$. A concentração do substrato na qual $V_0$ é metade da $V_{máx}$ é o $K_m$, a constante de Michaelis. A concentração da enzima em experimentos como este geralmente é tão baixa que [S] ≫ [E], mesmo quando [S] é descrita como baixa ou relativamente baixa. As unidades usadas neste gráfico são unidades típicas para reações não catalisadas e apenas ajudam a ilustrar o significado de $V_0$ e [S]. (Observe que a curva descreve *parte* de uma hipérbole retangular com uma das assíntotas em $V_{máx}$. Caso a curva continuasse abaixo de [S] = 0, ela se aproximaria da assíntota vertical em [S] = $-K_m$.)

reação típica, a enzima pode estar presente em quantidades nanomolares, enquanto [S] pode estar em uma ordem de magnitude cinco ou seis vezes maior. Se apenas o início da reação for monitorado (frequentemente os primeiros 60 segundos, ou menos), a mudança em [S] pode estar limitada a alguns poucos pontos percentuais e [S] pode ser considerada constante. $V_0$ pode ser explorado em função de [S], que é ajustada pelo investigador. O efeito da variação de [S] sobre $V_0$ quando a concentração da enzima é mantida constante está mostrado na **Figura 6-11**. Em concentrações relativamente baixas de substrato, $V_0$ aumenta quase linearmente com o aumento de [S]. Em altas concentrações de substrato, $V_0$ aumenta em pequenas quantidades em resposta ao aumento da [S]. Enfim, é atingido um ponto além do qual o aumento de [S] leva a um aumento insignificantemente pequeno em $V_0$. Essa região de $V_0$ tipo platô está próxima à **velocidade máxima**, $\boldsymbol{V_{máx}}$.

O complexo ES é a chave para entender este comportamento catalítico, e por isso foi o ponto inicial da nossa discussão sobre catálise. O padrão da cinética mostrada na Figura 6-11 levou Victor Henri, seguindo o caminho proposto por Wurtz, a propor, em 1903, que a combinação de uma enzima com a molécula do substrato formando um complexo ES é uma etapa necessária na catálise enzimática. Essa ideia foi ampliada em uma teoria geral de ação de enzimas, particularmente por Leonor Michaelis e Maud Menten, em 1913. Os dois postularam que a enzima primeiramente combina-se de modo reversível com o substrato, formando um complexo enzima-substrato em uma etapa reversível e relativamente rápida:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \qquad (6\text{-}7)$$

Então, o complexo ES é rompido em uma segunda etapa mais lenta, fornecendo a enzima livre e o produto P:

$$ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E + P \qquad (6\text{-}8)$$

Uma vez que a segunda reação, por ser mais lenta (Equação 6-8), limita a velocidade da reação total, a velocidade total deve ser proporcional à concentração das espécies que reagem na segunda etapa, isto é, ES.

Em determinado instante de uma reação catalisada por enzima, a enzima existe em duas formas, na forma livre ou não combinada (E) na forma combinada (ES). Em baixa [S], a maior parte da enzima está na forma não combinada E. Assim, a velocidade é proporcional à [S] porque o equilíbrio da Equação 6-7 é deslocado na direção da formação de mais ES à medida que [S] aumenta. A velocidade inicial máxima de uma reação catalisada ($V_{máx}$) ocorre quando quase toda a enzima estiver presente como complexo ES e [E] é

Leonor Michaelis, 1875-1949

Maud Menten, 1879-1960

desprezível. Nessas condições, a enzima está "saturada" com o substrato, e então um incremento de [S] não produz efeito na velocidade. Essa condição ocorre quando [S] for alta o suficiente para que essencialmente toda a enzima livre se converta na forma ES. Após o rompimento do complexo ES, fornecendo produto (P), a enzima fica livre para catalisar a reação de mais uma molécula do substrato (e sob condições saturantes segue fazendo isso rapidamente). O efeito da saturação é uma característica que diferencia a catálise enzimática, sendo responsável pelo platô observado na Figura 6-11. Às vezes, o padrão mostrado na Figura 6-11 é denominado cinética de saturação.

Logo que a enzima é misturada com um grande excesso de substrato, há um período inicial, o **estado pré-estacionário**, durante o qual a concentração de ES aumenta. Normalmente, esse período é muito curto para ser observado com facilidade, demora apenas microssegundos, e não é evidente na Figura 6-10. A reação rapidamente atinge o **estado estacionário** no qual [ES] (e as concentrações de qualquer outro intermediário) permanece constante ao longo do tempo. O conceito de estado estacionário foi introduzido por G.E. Briggs e Haldane, em 1925. A determinação de $V_0$ geralmente reflete o estado estacionário. Embora $V_0$ limite-se à parte inicial da reação, a análise da velocidade inicial é denominada **cinética do estado estacionário**.

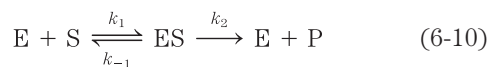
## A relação entre a concentração do substrato e a velocidade da reação pode ser expressa quantitativamente

A curva que expressa a relação entre [S] e $V_0$ (Figura 6-11) tem a mesma forma geral para a maioria das enzimas (aproximadamente uma hipérbole retangular) e pode ser expressa algebricamente pela equação de Michaelis-Menten. Michaelis e Menten deduziram essa equação partindo da sua hipótese básica de que a etapa limitante da velocidade em uma reação enzimática é a quebra do complexo ES em produto e enzima livre. A equação é

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}}[\text{S}]}{K_\text{m} + [\text{S}]} \qquad (6\text{-}9)$$

Todos esses termos são facilmente determinados do ponto de vista experimental, e a constante de Michaelis, $K_\text{m}$, pode ser medida experimentalmente.

Agora, serão examinadas as bases lógicas das etapas algébricas de uma dedução moderna da equação de Michaelis-Menten, que inclui a hipótese do estado estacionário introduzida por Briggs e Haldane. A dedução começa com as etapas básicas de formação e quebra de ES (Equações 6-7 e 6-8). No início da reação, a concentração do produto, [P], é desprezível e permite simplificar considerando que a reação inversa, P → S (descrita por $k_{-2}$), pode ser ignorada. Essa suposição não é crítica, mas simplifica a dedução. A reação total reduz-se a

$$\text{E} + \text{S} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \text{ES} \xrightarrow{k_2} \text{E} + \text{P} \qquad (6\text{-}10)$$

$V_0$ é determinada pela quebra de ES formando o produto, que é determinado por [ES]:

$$V_0 = k_2[\text{ES}] \qquad (6\text{-}11)$$

Uma vez que [ES], da Equação 6-11, não pode ser determinada facilmente, deve-se iniciar encontrando uma expressão alternativa para este termo. Primeiro será introduzido o termo $[\text{E}_\text{t}]$, representando a concentração total da enzima (a soma da enzima livre e ligada ao substrato). A enzima livre, ou não ligada, pode ser representada por $[\text{E}_\text{t}] - [\text{ES}]$. Também, porque [S] normalmente é muito maior que $[\text{E}_\text{t}]$, a quantidade de substrato ligado à enzima em um dado tempo é desprezível em comparação com a quantidade total de enzima, [S]. Tendo essas condições em mente, as próximas etapas levam a uma expressão para $V_0$ em termos de parâmetros facilmente mensuráveis.

*Etapa 1* As velocidades de formação e quebra de ES são determinadas pelas etapas governadas pelas constantes $k_1$ (formação) e $k_{-1} + k_{+2}$ (quebra em reagentes e produtos, respectivamente), segundo as expressões

$$\text{Velocidade de formação de ES} = k_1([\text{E}_\text{t}] - [\text{ES}])[\text{S}] \qquad (6\text{-}12)$$

$$\text{Velocidade de quebra de ES} = k_{-1}[\text{ES}] + k_2[\text{ES}] \qquad (6\text{-}13)$$

*Etapa 2* Deve-se, agora, fazer uma suposição importante: a velocidade inicial da reação reflete o estado estacionário, no qual [ES] é constante. Isto é, a velocidade da formação de ES é igual à velocidade da quebra de ES. Isso é chamado de **hipótese do estado estacionário**. As expressões das Equações 6-12 e 6-13 são igualadas no estado estacionário, resultando em

$$k_1([\text{E}_\text{t}] - [\text{ES}])[\text{S}] = k_{-1}[\text{ES}] + k_2[\text{ES}] \qquad (6\text{-}14)$$

*Etapa 3* Em uma série de etapas algébricas, pode-se resolver a Equação 6-14 para [ES]. Primeiro, o lado esquerdo da equação é multiplicado e o lado direito é simplificado:

$$k_1[\text{E}_\text{t}][\text{S}] - k_1[\text{ES}][\text{S}] = (k_{-1} + k_2)[\text{ES}] \qquad (6\text{-}15)$$

Adicionando o termo $k_1$[ES], [S] aos dois lados da equação e simplificando,

$$k_1[\text{E}_\text{t}][\text{S}] = (k_1[\text{S}] + k_{-1} + k_2)[\text{ES}] \qquad (6\text{-}16)$$

Então, a solução desta equação para [ES] é

$$[\text{ES}] = \frac{k_1[\text{E}_\text{t}][\text{S}]}{k_1[\text{S}] + k_{-1} + k_2} \qquad (6\text{-}17)$$

Agora isso pode ser ainda mais simplificado, combinando as constantes de velocidade em uma expressão:

$$[\text{ES}] = \frac{[\text{E}_\text{t}][\text{S}]}{[\text{S}] + (k_{-1} + k_2)/k_1} \qquad (6\text{-}18)$$

O termo $(k_{-1} + k_2)/k_1$ é definido como **constante de Michaelis, $K_\text{m}$**. Substituindo esse termo na Equação 6-18, a expressão é simplificada para

$$[\text{ES}] = \frac{[\text{E}_\text{t}][\text{S}]}{K_\text{m} + [\text{S}]} \qquad (6\text{-}19)$$

*Etapa 4* Agora é possível expressar $V_0$ em termos de [ES]. Substituindo o lado direito da Equação 6-19 para [ES] na Equação 6-11 obtém-se

$$V_0 = \frac{k_2[\text{E}_\text{t}][\text{S}]}{K_\text{m} + [\text{S}]} \qquad (6\text{-}20)$$

Esta equação pode ser simplificada ainda mais. Uma vez que a velocidade máxima ocorre quando a enzima está satu-

rada (isto é, com $[ES] = [E_t]$), $V_{máx}$ pode ser definida como $k_2[E_t]$. A substituição desta equação na Equação 6-20 dá a Equação 6-9:

$$V_0 = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + [S]}$$

Esta é a **equação de Michaelis-Menten**, a **equação da velocidade** da reação com um único substrato, catalisada por uma enzima. Ela define a relação quantitativa entre a velocidade inicial, $V_0$, a velocidade máxima, $V_{máx}$, e a concentração inicial de substrato, [S], todas em relação à constante de Michaelis, $K_m$. Observe que $K_m$ tem unidades de concentração molar. Será que a equação se ajusta às observações experimentais? Sim. Isso pode ser confirmado considerando as situações limitantes nas quais [S] é muito alta ou muito baixa, como está mostrado na **Figura 6-12**.

Uma relação numérica importante emerge da equação de Michaelis-Menten no caso especial quando $V_0$ é exatamente metade da $V_{máx}$ (Figura 6-12). Então

$$\frac{V_{máx}}{2} = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + [S]} \qquad (6\text{-}21)$$

Dividindo-se por $V_{máx}$, obtém-se

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \qquad (6\text{-}22)$$

Resolvendo para $K_m$, obtém-se $K_m + [S] = 2[S]$, ou

$$K_m = [S], \quad \text{quando} \quad V_0 = \tfrac{1}{2}V_{máx} \qquad (6\text{-}23)$$

Esta é uma definição prática e muito útil de $K_m$: $K_m$ equivale à concentração do substrato na qual $V_0$ é metade da $V_{máx}$.

A equação de Michaelis-Menten (Equação 6-9) pode ser transformada algebricamente em versões úteis para a determinação prática de $K_m$ e $V_{máx}$ (Quadro 6-1) e, como será descrito posteriormente, na análise da ação de inibidores (ver Quadro 6-2 na p. 209).

**FIGURA 6-12 Dependência da velocidade inicial da concentração de substrato.** Este gráfico mostra os parâmetros cinéticos que definem os limites da curva em [S] elevada e baixa. Em baixa [S], $K_m \gg [S]$, e o termo [S] no denominador na equação de Michaelis-Menten (Equação 6-9) torna-se desprezível. A equação fica simplificada a $V_0 = V_{máx}[S]/K_m$, e $V_0$ apresenta uma dependência linear de [S], como observado aqui. Em alta [S], quando $[S] \gg K_m$, o termo $K_m$, denominador na equação de Michaelis-Menten, torna-se desprezível, e a equação fica simplificada a $V_0 = V_{máx}$, o que é consistente com o platô observado em [S] elevada. A equação de Michaelis-Menten é, portanto, consistente com a dependência observada de $V_0$ por [S], e a forma da curva é definida pelos termos $V_{máx}/K_m$ em baixa [S] e $V_{máx}$ em alta [S].

## Os parâmetros cinéticos são utilizados para comparar a atividade de enzimas

É importante distinguir entre a equação de Michaelis-Menten e o mecanismo cinético específico no qual ela foi baseada originalmente. A equação descreve o comportamento cinético da grande maioria das enzimas, sendo que todas as enzimas que exibem uma dependência hiperbólica de $V_0$ sobre [S] são consideradas como seguindo a **cinética de Michaelis-Menten**. A regra prática de que $K_m$ = [S] quando $V_0 = \frac{1}{2} V_{máx}$ (Equação 6-23) é válida para todas as enzimas que seguem a cinética de Michaelis-Menten. (As enzimas regulatórias são as exceções mais importantes à cinética de Michaelis-Menten, assunto discutido na Seção 6.5.) Entretanto, a equação de Michaelis-Menten não depende do mecanismo de reação relativamente simples em duas etapas proposto por Michaelis e Menten (Equação 6-10). Muitas das enzimas que seguem a cinética de Michaelis-Menten têm mecanismos de reação muito diferentes, e mesmo enzimas que catalisam reações com seis ou oito etapas identificáveis geralmente apresentam o mesmo comportamento cinético de estado estacionário. Mesmo que a Equação 6-23 seja verdadeira para muitas enzimas, o significado verdadeiro tanto de $V_{máx}$ como de $K_m$ pode ser diferente para enzimas diferentes. Essa é uma limitação importante da abordagem do estado estacionário para explicar a cinética enzimática. Os parâmetros $V_{máx}$ e $K_m$ podem ser obtidos experimentalmente para qualquer enzima, mas fornecem pouca informação sobre o número, as velocidades ou a natureza química das etapas da reação. Apesar disso, a cinética do estado estacionário é a linguagem padrão pela qual os bioquímicos comparam e caracterizam as eficiências catalíticas das enzimas.

**Interpretação de $V_{máx}$ e $K_m$.** A Figura 6-12 mostra um método gráfico simples para obter o valor aproximado de $K_m$. Um procedimento mais conveniente, usando o **gráfico duplo-recíproco**, está mostrado no Quadro 6-1. O $K_m$ pode variar muito de acordo com a enzima e mesmo para substratos diferentes de uma mesma enzima (Tabela 6-6). Algumas vezes o termo $K_m$ é usado (em geral, inapropriadamente) como indicador da afinidade da enzima pelo seu substrato. O significado verdadeiro do $K_m$ depende de aspectos específicos do mecanismo da reação, como o número e as velocidades relativas das várias etapas. Para uma reação de duas etapas,

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \qquad (6\text{-}24)$$

Quando $k_2$ é a etapa limitante, $k_2 \ll k_{-1}$, e o $k_m$ fica reduzido a $k_{-1}/k_1$, que é definido como a **constante de dissociação, $K_d$**, do complexo ES. Nessas condições, $K_m$ representa uma medida da afinidade da enzima pelo substrato no complexo ES. Entretanto, esse cenário não se aplica para a maioria das enzimas. Algumas vezes $k_2 \gg k_{-1}$, e então $K_m = k_2/k_1$. Em outros casos, $k_2$ *e* $k_{-1}$ são comparáveis e $K_m$ torna-se uma função mais complexa de todas

## QUADRO 6-1 Transformações da equação de Michaelis-Menten: o gráfico de duplos-recíprocos

A equação de Michaelis-Menten

$$V_0 = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + [S]}$$

pode ser transformada algebricamente em equações mais práticas para fazer gráficos com dados experimentais. Uma transformação muito comum é deduzida simplesmente tomando as recíprocas dos dois lados da equação de Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{máx}[S]}$$

Separando os componentes do numerador no lado direito da equação obtém-se

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{máx}[S]} + \frac{[S]}{V_{máx}[S]}$$

que é simplificado para

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{máx}[S]} + \frac{1}{V_{máx}}$$

Essa forma da equação de Michaelis-Menten é denominada **equação de Lineweaver-Burk**. No caso das enzimas que obedecem a relação de Michaelis-Menten, um gráfico de $1/V_0$ *versus* 1/[S] (o "duplo-recíproco" de um gráfico de $V_0$ *versus* [S] é usado) produz uma linha reta (Figura Q-1). Essa linha tem uma inclinação de $K_m/V_{máx}$ no eixo $1/V_0$ e uma intersecção de $-1/K_m$ no eixo 1/[S]. A representação duplo-recíproca, também denominada gráfico de Lineweaver-Burk, tem a grande vantagem de permitir uma determinação mais acurada de $V_{máx}$ que pode ser obtida apenas *aproximadamente* nos gráficos simples de $V_0$ *versus* [S] (ver Figura 6-12).

Outras transformações da equação de Michaelis-Menten são feitas, cada uma com uma vantagem específica para a análise de dados cinéticos. (Ver Problema 14 no final deste capítulo.)

O gráfico duplo-recíproco das velocidades de uma reação enzimática é muito útil para diferenciar entre certos tipos de mecanismos de reação enzimática (ver Figura 6-14) e na análise da inibição de enzimas (ver Quadro 6-2).

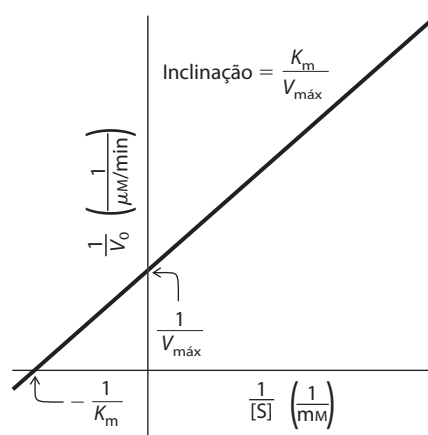



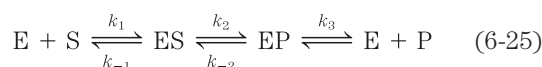
**FIGURA Q-1** Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk.

três constantes de velocidade (Equação 6-24). A equação de Michaelis-Menten e o comportamento característico de saturação continuam válidos, mas $K_m$ não pode ser considerado como uma simples medida da afinidade da enzima pelo substrato. Mesmo em casos mais comuns, nos quais a reação ocorre em várias etapas após a formação de ES, o $K_m$ pode se tornar uma função muito complexa de muitas constantes de velocidade.

**TABELA 6-6** $K_m$ de algumas enzimas e seus substratos

| Enzima | Substrato | $K_m$ (mM) |
|---|---|---|
| Hexocinase (cérebro) | ATP | 0,4 |
| | D-Glicose | 0,05 |
| | D-Frutose | 1,5 |
| Anidrase carbônica | $HCO_3^-$ | 26 |
| Quimotripsina | Gliciltirosilglicina | 108 |
| | *N*-benzoiltirosinamida | 2,5 |
| $\beta$-Galactosidade | D-Lactose | 4,0 |
| Treonina-desidratase | L-Treonina | 5,0 |

A grandeza $V_{máx}$ também varia muito entre enzimas diferentes. Se uma enzima reage pelo mecanismo de duas etapas de Michaelis-Menten, então $V_{máx} = k_2[E_t]$, onde $k_2$ é a etapa limitante da velocidade. Entretanto, o número de etapas da reação e a identidade das etapas limitantes da velocidade podem variar de acordo com a enzima. Por exemplo, considere a situação bem comum na qual a liberação do produto, EP $\rightarrow$ E + P, é a etapa limitante da velocidade. No início da reação (quando [P] é baixo), a reação total pode ser descrita pelo esquema

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} EP \overset{k_3}{\rightleftharpoons} E + P \qquad (6\text{-}25)$$

Nesse caso, na saturação, a maior parte da enzima está na forma EP e $V_{máx} = k_3[E_t]$. Isso é útil para definir uma constante de velocidade mais geral, $\boldsymbol{k_{cat}}$, para descrever a etapa limitante de qualquer reação catalisada por enzimas na saturação. Se a reação tiver várias etapas e uma delas for claramente a etapa limitante da velocidade, $k_{cat}$ equivale à constante de velocidade dessa etapa limitante. Para o caso da reação simples correspondendo à equação 6-10, $k_{cat} = k_2$. Para a reação da Equação 6-25, $k_{cat} = k_3$. Quando várias etapas são parcialmente limitantes, $k_{cat}$ pode tornar-

-se uma função complexa com várias das constantes de velocidade que definem individualmente cada uma das etapas da reação. Na equação de Michaelis-Menten, $k_{cat} = V_{máx}/[E_t]$, e a Equação 6-9 torna-se

$$V_0 = \frac{k_{cat}[E_t][S]}{K_m + [S]} \qquad (6\text{-}26)$$

A constante $k_{cat}$ é a constante de primeira ordem da velocidade, tendo como unidade a recíproca do tempo. Ela também é chamada de **número de renovação** ("*turnover*"), sendo, quando a enzima estiver saturada com o substrato, equivalente ao número de moléculas de substrato convertidas em produto por unidade de tempo por uma única molécula de enzima. Os números de renovação de muitas enzimas estão apresentados na Tabela 6-7.

**TABELA 6-7** Número de renovação (*turnover*), $k_{cat}$, de algumas enzimas

| Enzima | Substrato | $k_{cat}$ ($s^{-1}$) |
|---|---|---|
| Catalase | $H_2O_2$ | 40.000.000 |
| Anidrase carbônica | $HCO_3^-$ | 400.000 |
| Acetilcolinesterase | Acetilcolina | 14.000 |
| β-Lactamase | Benzilpenicilina | 2.000 |
| Fumarase | Fumarato | 800 |
| Proteína RecA (uma ATPase) | ATP | 0,5 |

**Comparação entre eficiências e mecanismos catalíticos.** Os parâmetros cinéticos $k_{cat}$ e $k_m$ são úteis para estudar e comparar enzimas diferentes, independentemente se os mecanismos de reação são simples ou complexos. Cada enzima tem valores de $k_{cat}$ e $K_m$ que refletem o ambiente celular, a concentração de substrato normalmente encontrada *in vivo* pela enzima e a química da reação catalisada.

Os parâmetros $k_{cat}$ e $K_m$ também possibilitam que se avalie a eficiência cinética das enzimas, embora individualmente cada um desses parâmetros seja insuficiente para isso. Duas enzimas que catalisam reações diferentes podem ter o mesmo $k_{cat}$ (número de renovação), entretanto, as velocidades dessas reações quando não catalisadas podem ser diferentes entre si e, portanto, o aumento de velocidade propiciado por cada enzima pode ser muito diferente. Do ponto de vista experimental, o $K_m$ de uma enzima tende a ser similar à concentração do substrato presente na célula. O $K_m$ de uma enzima que atue sobre um substrato presente em concentrações muito baixas na célula geralmente é menor do que o $K_m$ de uma enzima que age sobre um substrato mais abundante.

A melhor maneira de comparar as eficiências catalíticas de enzimas diferentes, ou o número de vezes que diferentes substratos são catalisados por uma mesma enzima, é comparar a relação $k_{cat}/K_m$ para as duas reações. Esse parâmetro, algumas vezes denominado **constante de especificidade**, é a constante de velocidade para a conversão de E + S em E + P. Quando $[S] \ll K_m$, a Equação 6-26 se reduz a

$$V_0 = \frac{k_{cat}}{K_m}[E_t][S] \qquad (6\text{-}27)$$

Nesse caso, $V_0$ depende da concentração dos dois reagentes, $[E_t]$ e [S], e, consequentemente, essa é a equação de velocidade de segunda ordem, e a constante $k_{cat}/K_m$ é a constante de velocidade de segunda ordem, com unidades $M^{-1}s^{-1}$. Há um limite superior para $k_{cat}/K_m$, imposto pela velocidade com que E e S podem se difundir em soluções aquosas. O limite determinado pela difusão é de $10^8$ a $10^9$ $M^{-1}s^{-1}$, e muitas enzimas têm $k_{cat}/K_m$ próximo a esta faixa (Tabela 6-8). Diz-se que essas enzimas atingiram a perfeição catalítica. Observe que diferentes valores de $k_{cat}$ e $K_m$ podem levar a essa relação máxima.

**PROBLEMA RESOLVIDO 6-1** Determinação do $K_m$

Foi descoberta uma enzima que catalisa a reação química

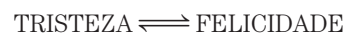
$$\text{TRISTEZA} \rightleftharpoons \text{FELICIDADE}$$

Uma equipe de pesquisadores motivados dedicou-se a estudar uma enzima, que denominaram de felicidase. Eles verificaram que o $k_{cat}$ da felicidase é de 600 $s^{-1}$ e realizaram vários experimentos.

**TABELA 6-8** Enzimas cujos valores de $k_{cat}/K_m$ estão próximos ao limite imposto pela difusão ($10^8$ a $10^9$ $M^{-1}s^{-1}$)

| Enzima | Substrato | $k_{cat}$ ($s^{-1}$) | $K_m$ (M) | $k_{cat}/K_m$ ($M^{-1}s^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| Acetilcolinesterase | Acetilcolina | $1,4 \times 10^4$ | $9 \times 10^{-5}$ | $1,6 \times 10^8$ |
| Anidrase carbônica | $CO_2$ | $1 \times 10^6$ | $1,2 \times 10^{-2}$ | $8,3 \times 10^7$ |
| | $HCO_3^-$ | $4 \times 10^5$ | $2,6 \times 10^{-2}$ | $1,5 \times 10^7$ |
| Catalase | $H_2O_2$ | $4 \times 10^7$ | $1,1 \times 10^0$ | $4 \times 10^7$ |
| Crotonase | Crotonil-CoA | $5,7 \times 10^3$ | $2 \times 10^{-5}$ | $2,8 \times 10^8$ |
| Fumarase | Fumarato | $8 \times 10^2$ | $5 \times 10^{-6}$ | $1,6 \times 10^8$ |
| | Malato | $9 \times 10^2$ | $2,5 \times 10^{-5}$ | $3,6 \times 10^7$ |
| β-Lactamase | Benzoilpenicilina | $2,0 \times 10^3$ | $2 \times 10^{-5}$ | $1 \times 10^8$ |

**Fonte:** Fersht, A. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science*, p. 166, W.H. Freeman and Company, Nova York.

A velocidade da reação, $V_0$, é 9,6 $\mu$Ms$^{-1}$ quando $[E_t]$ = 20 nM e [TRISTEZA] = 40 $\mu$M. Calcule o $K_m$ para o substrato TRISTEZA.

**Solução:** $k_{cat}$, $[E_t]$, [S] e $V_0$ são conhecidos e deseja-se saber o valor de $K_m$. A Equação 6-26, na qual a equação de Michaelis-Menten tem $V_{máx}$ substituído por $k_{cat}[E_t]$, é a mais apropriada para resolver este problema. Substituindo os valores na Equação 6-26 pode-se obter o valor de $K_m$.

$$V_0 = \frac{k_{cat}[E_t][S]}{K_m + [S]}$$

$$9{,}6\ \mu M\ s^{-1} = \frac{(600\ s^{-1})(0{,}020\ \mu M)(40\ \mu M)}{K_m + 40\ \mu M}$$

$$9{,}6\ \mu M\ s^{-1} = \frac{480\ \mu M^2\ s^{-1}}{K_m + 40\ \mu M}$$

$$9{,}6\ \mu M\ s^{-1}(K_m + 40\ \mu M) = 480\ \mu M^2\ s^{-1}$$

$$K_m + 40\ \mu M = \frac{480\ \mu M^2\ s^{-1}}{9{,}6\ \mu M\ s^{-1}}$$

$$K_m + 40\ \mu M = 50\ \mu M$$

$$K_m = 50\ \mu M - 40\ \mu M$$

$$K_m = 10\ \mu M$$

Após obter experiência em trabalhar com essa equação, é possível identificar atalhos para resolver problemas como este. Por exemplo, pode-se calcular $V_{máx}$ sabendo-se que $k_{cat}[E_t] = V_{máx}$ (neste caso 600 s$^{-1}$ × 0,020 $\mu$M = 12 $\mu$M s$^{-1}$). Um rearranjo simples da Equação 6-26 pela divisão de ambos os lados por $V_{máx}$ dá

$$\frac{V_0}{V_{máx}} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Então, a relação $V_0/V_{máx}$ = 9,6 $\mu$M s$^{-1}$/ 12 $\mu$M s$^{-1}$ = [S]/($K_m$ + [S]). Isso simplifica o processo de calcular o $K_m$, dando 0,25[S] ou 10 $\mu$M.

**PROBLEMA RESOLVIDO 6-2** **Determinação de [S]**

Em outro experimento com a felicidase, usando $[E_t]$ = 10 nM, a velocidade da reação, $V_0$, medida foi de 3 $\mu$M s$^{-1}$. Qual a [S] usada nesse experimento?

**Solução:** Usando a mesma lógica do Problema Resolvido 6-1, verifica-se que a $V_{máx}$ nessa concentração de enzima é 6 $\mu$M s$^{-1}$. Observe que a $V_0$ é exatamente metade da $V_{máx}$. Recorde que $K_m$, por definição, é igual a [S] quando $V_0$ = ½$V_{máx}$. Então, nesse problema [S] deve ser igual a $K_m$, ou 10 $\mu$M. Se $V_0$ tiver qualquer valor diferente de ½$V_{máx}$, simplesmente se usa a expressão $V_0/V_{máx}$ = [S]/($K_m$ + [S]) para obter [S].

## Muitas enzimas catalisam reações com dois ou mais substratos

Foi visto como a [S] afeta a velocidade de uma reação enzimática simples (S → P) com apenas uma molécula de substrato. Na maioria das reações enzimáticas, entretanto, duas (e algumas vezes mais) moléculas de substratos diferentes ligam-se à enzima e participam da reação. Por exemplo, na reação catalisada pela hexocinase, os substratos são moléculas de ATP e glicose e os produtos são ADP e glicose-6-fosfato:

$$\text{ATP + glicose} \rightarrow \text{ADP + glicose-6-fosfato}$$

As velocidades dessas reações de bissubstrato também podem ser analisadas pela abordagem de Michaelis-Menten. A hexocinase tem um $K_m$ característico para cada um dos seus substratos (Tabela 6-6).

As reações enzimáticas com dois substratos geralmente envolvem a transferência de um átomo de um grupo funcional de um substrato para o outro. Essas reações ocorrem por vários mecanismos diferentes. Em alguns casos, ambos os substratos ligam-se à enzima simultaneamente em algum ponto do curso da reação, formando um complexo não covalente ternário (**Figura 6-13a**). Os substratos ligam-se segundo uma sequência aleatória ou em uma sequência com ordem específica. Em outros casos, o primeiro substrato é convertido em um produto que se dissocia antes que o segundo substrato se ligue, de modo que não há formação de um complexo ternário. Um exemplo desse último caso é o mecanismo de pingue-pongue, ou de deslocamento duplo (Figura 6-13b). A cinética de estado estacionário geralmente ajuda a distinguir entre essas possibilidades (**Figura 6-14**).

## A cinética do estado pré-estacionário pode fornecer evidências de etapas específicas das reações

A cinética foi apresentada como o principal método de estudo das etapas de uma reação enzimática, e agora será

**(a) Reação enzimática envolvendo um grupo ternário**

Ordem aleatória

$E \rightleftharpoons ES_1 \rightleftharpoons ES_1S_2$; $E \rightleftharpoons ES_2 \rightleftharpoons ES_1S_2$; $ES_1S_2 \longrightarrow E + P_1 + P_2$

Ordenado

$E + S_1 \rightleftharpoons ES_1 \overset{S_2}{\rightleftharpoons} ES_1S_2 \longrightarrow E + P_1 + P_2$

**(b) Reação enzimática na qual não há formação de um complexo ternário**

$E + S_1 \rightleftharpoons ES_1 \rightleftharpoons E'P_1 \overset{P_1}{\rightleftharpoons} E' \overset{S_2}{\rightleftharpoons} E'S_2 \longrightarrow E + P_2$

**FIGURA 6-13 Mecanismo comum das reações bissubstrato catalisadas por enzimas. (a)** A enzima e ambos os substratos juntam-se formando um complexo ternário. No caso de ligação ordenada, o substrato 1 deve se ligar antes que o substrato 2 se ligue de modo produtivo. No caso de ligação ao acaso, os substratos podem se ligar em qualquer ordem. **(b)** Há a formação de um complexo enzima-substrato, o produto deixa o complexo, a enzima modificada forma um segundo complexo com a molécula do outro substrato, o segundo produto é liberado e a enzima é regenerada. O substrato 1 pode transferir um grupo funcional para a enzima (formando uma enzima modificada covalentemente, E′) que, depois, é transferido para o substrato 2. Esse mecanismo é denominado mecanismo de pingue-pongue ou mecanismo de deslocamento duplo.

feita uma discussão preliminar sobre as limitações que os parâmetros cinéticos mais comuns têm em fornecerem essas informações. Os dois parâmetros experimentais mais importantes obtidos da cinética do estado estacionário são $k_{cat}$ e $k_{cat}/K_m$. A variação de $k_{cat}$ e $k_{cat}/K_m$ em função da variação de pH ou da temperatura pode fornecer informações adicionais sobre as etapas do caminho da reação. No caso de reações de bissubstratos, a cinética do estado estacionário pode ajudar a determinar se um complexo ternário é formado durante a reação (Figura 6-14). Geralmente, para formar um quadro mais completo são necessários métodos cinéticos que vão além do alcance de um texto introdutório. Aqui será apresentada brevemente uma das abordagens cinéticas mais importantes para o estudo de mecanismos de reações, a cinética do estado pré-estacionário.

Uma descrição completa de uma reação catalisada por uma enzima requer a medida direta das velocidades de cada uma das etapas, por exemplo, a associação da enzima com o substrato formando o complexo ES. Durante o estado pré-estacionário (ver p. 202), as velocidades de muitas das etapas da reação podem ser medidas independentemente e também podem ser observados os eventos que uma única molécula de substrato sofre durante a reação. Como a fase de estado pré-estacionário costuma ser muito curta, geralmente os experimentos necessitam de técnicas especiais para fazer misturas e obter amostras muito rapidamente. Um dos objetivos é obter um quadro completo e quantitativo das mudanças energéticas que ocorrem durante a reação. Como ressaltado anteriormente, as velocidades e os equilíbrios estão relacionados com a variação de energia livre durante a reação. Outro objetivo é medir as velocidades das etapas individuais da reação. Em muitos casos, os pesquisadores foram capazes de registrar as velocidades de cada uma das muitas etapas da reação enzimática. Alguns exemplos da aplicação da cinética do estado pré-estacionário estão incluídos na descrição de enzimas específicas apresentada na Seção 6.4.

**FIGURA 6-14 Análise da cinética de estado estacionário das reações bissubstrato.** Nestes gráficos duplo-recíprocos (ver Quadro 6-1), a concentração do substrato 1 varia, enquanto a concentração do substrato 2 é mantida constante. Isso é repetido para vários valores de $[S_2]$, gerando várias retas independentes. **(a)** Retas que se interceptam indicam que um complexo ternário foi formado na reação; **(b)** retas paralelas indicam uma via pingue-pongue (deslocamento duplo).

## As enzimas estão sujeitas à inibição reversível e irreversível

Inibidores de enzimas são moléculas que interferem com a catálise, diminuindo ou interrompendo as reações enzimáticas. As enzimas catalisam quase todos os processos celulares e não deve surpreender que os inibidores de enzimas estejam entre os medicamentos mais importantes. Por exemplo, a aspirina (acetilsalicilato) inibe a enzima que catalisa a primeira etapa da síntese das prostaglandinas, compostos envolvidos em vários processos, inclusive em alguns que produzem dor. O estudo dos inibidores enzimáticos também fornece rica informação sobre os mecanismos enzimáticos e tem ajudado a desvendar algumas vias metabólicas. Existem duas amplas classes de inibidores de enzimas: reversíveis e irreversíveis.

**Inibição reversível.** Um tipo muito comum de **inibição reversível** é denominado competitivo (**Figura 6-15a**). Um **inibidor competitivo** compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima. À medida que o inibidor (I) ocupa o sítio ativo, ele impede que o substrato se ligue à enzima. Muitos inibidores competitivos têm estrutura similar à estrutura do substrato e se combinam com a enzima formando um complexo EI, mas que não leva à catálise. Mesmo ligações desse tipo que sejam transitórias reduzem a eficiência da enzima. Considerando-se a geometria molecular dos inibidores, pode-se chegar a conclusões sobre quais as partes do substrato normal que se ligam à enzima. A inibição competitiva pode ser analisada quantitativamente usando cinética do estado estacionário. Na presença de um inibidor competitivo, a equação de Michaelis-Menten (Equação 6-9) torna-se

$$V_0 = \frac{V_{máx}[S]}{\alpha K_m + [S]} \qquad (6\text{-}28)$$

quando

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \qquad \text{e} \qquad K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

A Equação 6-28 descreve características importantes da inibição competitiva. A variável determinada experimentalmente $\alpha K_m$, isto é, o $K_m$ observado na presença do inibidor, geralmente é denominada de $K_m$ "aparente".

Uma vez que o inibidor liga-se reversivelmente à enzima, a competição pode ser deslocada em favor do substra-

**FIGURA 6-15 Três tipos de inibição reversível. (a)** Inibidores competitivos ligam-se ao sítio ativo da enzima: $K_I$ é a constante de equilíbrio da ligação do inibidor a E. **(b)** Inibidores incompetitivos ligam-se em sítios diferentes, mas ligam-se apenas ao complexo ES; $K'_I$ é a constante de equilíbrio para a ligação a ES. **(c)** Inibidores mistos ligam-se a sítios separados, mas podem se ligar tanto a E quanto a ES.

to simplesmente pela adição de mais substrato. Quando [S] exceder muito a [I], é minimizada a probabilidade de uma molécula de inibidor se ligar à enzima, e a reação apresenta $V_{máx}$ normal. Entretanto, em [S] na qual $V_0 = ½\ V_{máx}$, a presença do inibidor aumenta o valor do $K_m$ aparente por um fator $\alpha$. Esse efeito no $K_m$ aparente, combinado com a ausência de efeito sobre $V_{máx}$, diagnostica uma inibição competitiva e é facilmente revelado por meio do gráfico duplo-recíproco (Quadro 6-2). A constante de equilíbrio para a ligação do inibidor ($K_I$) pode ser obtida a partir do mesmo gráfico.

Um tratamento terapêutico com base na competição pelo sítio ativo é utilizado para tratar pacientes que ingeriram metanol, um solvente utilizado em dutos de gás anticongelante. A álcool-desidrogenase hepática converte metanol em formaldeído, prejudicial para muitos tecidos. A cegueira é uma consequência muito comum da ingestão de metanol, pois os olhos são particularmente sensíveis ao formaldeído. O etanol compete de maneira eficiente com o metanol como substrato alternativo da álcool-desidrogenase. O efeito do etanol é como o de um inibidor competitivo, com a diferença de que o etanol também é substrato para a álcool-desidrogenase, e a sua concentração diminui à medida que a enzima o converte em acetaldeído. O tratamento do envenenamento por metanol é feito pela administração intravenosa lenta de etanol, a uma velocidade que mantenha uma concentração controlada de etanol no sangue por várias horas. A velocidade de formação de formaldeído diminui e, durante esse tempo, os rins filtram o metanol, que é excretado inocuamente na urina. ■

Dois outros tipos de inibição reversível, incompetitiva e mista, muitas vezes definidas em termos de reações de um só substrato, na prática são observados apenas em enzimas que têm dois ou mais substratos. Um **inibidor incompetitivo** (Figura 6-15b) liga-se em um sítio distinto do sítio ativo do substrato e, ao contrário do inibidor competitivo, liga-se apenas ao complexo ES. Na presença de um inibidor incompetitivo, a equação de Michaelis-Menten altera-se para

$$V_0 = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + \alpha'[S]} \quad (6\text{-}29)$$

onde

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_I} \qquad e \qquad K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

Como descrito na Equação 6-29, em altas concentrações de substrato, $V_0$ aproxima-se de $V_{máx}/\alpha'$. Então, um inibidor incompetitivo diminui a $V_{máx}$ medida. O $K_m$ aparente também diminui, porque a [S] necessária para atingir metade da $V_{máx}$ diminui por um fator de $\alpha'$.

Também no caso de um **inibidor misto** (Figura 6-15c) há ligação a um sítio distinto do sítio ativo, ao qual o substrato se liga. Nesse caso, o inibidor pode ligar-se tanto à enzima quanto a ES. A equação de velocidade que descreve a inibição mista é

$$V_0 = \frac{V_{máx}[S]}{\alpha K_m + \alpha'[S]} \quad (6\text{-}30)$$

onde $\alpha$ e $\alpha'$ são definidas como anteriormente. Em geral, um inibidor afeta a ambos, $K_m$ e $V_{máx}$. O caso especial em que $\alpha = \alpha'$, raramente encontrado experimentalmente, é definido como **inibição não competitiva**. O exame da Equação 6-30 mostra por que um inibidor não competitivo afeta $V_{máx}$, mas não $K_m$.

A Equação 6-30 é uma expressão geral dos efeitos de inibidores reversíveis, simplificando as expressões da inibição competitiva e da inibição incompetitiva quando $\alpha' = 1{,}0$ ou $\alpha = 1{,}0$, respectivamente. A partir dessa expressão pode-se resumir os efeitos dos inibidores sobre cada um

## QUADRO 6-2 Testes cinéticos para determinar o mecanismo de inibição

O gráfico duplo-recíproco (ver Quadro 6-1) possibilita uma maneira fácil de determinar se o inibidor de uma enzima é competitivo, incompetitivo ou misto. Dois conjuntos de experimentos devem ser feitos com a concentração de enzima mantida constante em cada conjunto. No primeiro conjunto de experimentos, [S] também é mantida constante, o que permite medir o efeito do aumento da concentração do inibidor [I] sobre a velocidade inicial $V_0$ (não mostrado na figura). No segundo conjunto de experimentos, [I] é mantida constante e [S] varia. Os resultados são usados para construir um gráfico $1/V_0$ *versus* 1/[S].

A Figura Q-1 mostra um conjunto de gráficos duplo-recíprocos, um obtido na ausência de inibidor e dois com diferentes concentrações de um inibidor competitivo. O aumento na [I] produz uma família de curvas, todas com uma intercepção comum no eixo $1/V_0$, mas com inclinações diferentes. Uma vez que a intercepção no eixo $1/V_0$ corresponde a $1/V_{máx}$, sabe-se que $V_{máx}$ não varia devido à presença de um inibidor competitivo. Isto é, independentemente de qual seja a concentração de um inibidor competitivo, há uma concentração de substrato alta o suficiente que deslocará o inibidor do sítio ativo da enzima. Na parte superior do gráfico é apresentado o rearranjo da Equação 6-28 na qual cada gráfico foi baseado. O valor de $\alpha$ pode ser calculado a partir da mudança na inclinação da curva em qualquer valor de [I]. Conhecendo-se [I] e $\alpha$, pode-se calcular $K_I$ a partir da expressão

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

No caso da inibição incompetitiva e da inibição mista, gráficos similares de dados de velocidades dão as famílias de retas mostradas nas Figuras Q-2 e Q-3. Mudanças na intercepção nos eixos indicam mudanças em $V_{máx}$ e $K_m$.

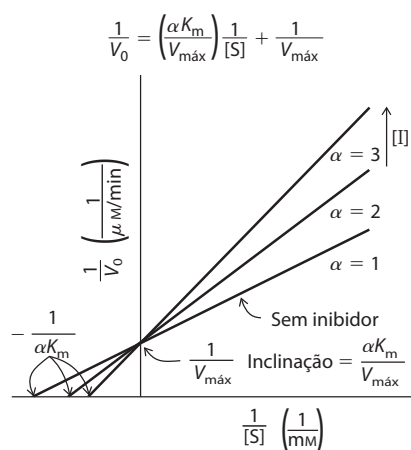



**FIGURA Q-1** Inibição competitiva.

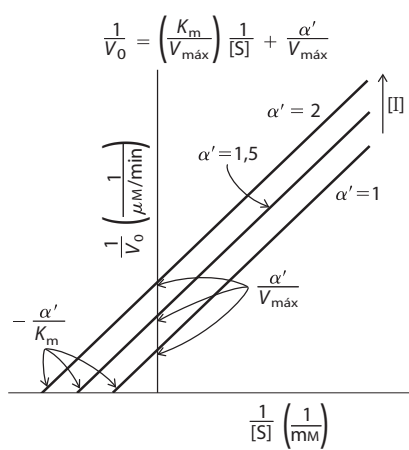



**FIGURA Q-2** Inibição incompetitiva.

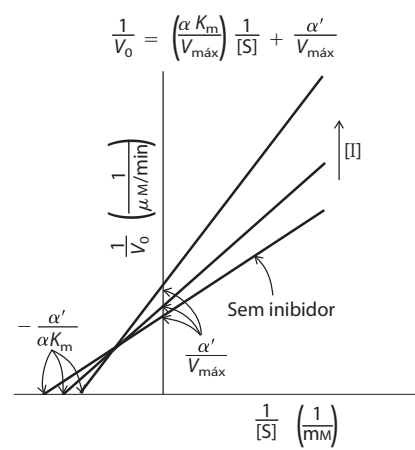



**FIGURA Q-3** Inibição mista.

dos parâmetros cinéticos. No caso de todos os inibidores reversíveis, $V_{máx}$ aparente = $V_{máx}/\alpha'$, porque o lado direito da Equação 6-30 sempre simplifica-se para $V_{máx}/\alpha'$ em concentrações de substrato suficientemente altas. No caso dos inibidores competitivos, $\alpha' = 1{,}0$, e assim pode ser ignorado. Tomando essa expressão pela $V_{máx}$ aparente pode-se deduzir uma expressão geral para $K_m$ aparente que mostra como esse parâmetro modifica-se pela presença de inibidores reversíveis. O $K_m$ aparente, como sempre, é igual à [S] na qual $V_0$ é metade da $V_{máx}$ aparente ou, de maneira mais geral, quando $V_0 = V_{máx}/2\alpha'$. Essa condição é encontrada quando $[S] = \alpha K_m/\alpha'$. Então, o $K_m$ aparente $= \alpha K_m/\alpha'$. Essa expressão é mais simples quando $\alpha$ e $\alpha'$ forem 1,0 (tanto na inibição incompetitiva quanto na inibição competitiva), como está resumido na Tabela 6-9.

Na prática, as inibições incompetitiva e mista são observadas apenas em enzimas com dois ou mais substratos, $S_1$ e $S_2$, os quais são muito importantes na análise experimental dessas enzimas. Se um inibidor ligar-se ao sítio normalmente ocupado por $S_1$, ele atuará como um inibidor competitivo em experimentos nos quais $[S_1]$ varie. Se um inibidor liga-se ao sítio normalmente ocupado por $S_2$, ele pode agir

**TABELA 6-9** Efeitos de inibidores reversíveis na $V_{máx}$ aparente e no $K_m$ aparente

| Tipo de inibidor | $V_{máx}$ aparente | $K_m$ aparente |
|---|---|---|
| Sem inibidor | $V_{máx}$ | $K_m$ |
| Competitivo | $V_{máx}$ | $\alpha K_m$ |
| Incompetitivo | $V_{máx}/\alpha'$ | $K_m/\alpha'$ |
| Misto | $V_{máx}/\alpha'$ | $\alpha K_m/\alpha$ |

como um inibidor misto ou incompetitivo de $S_1$. O padrão real de inibição observado dependerá do quanto os eventos de ligação de $S_1$ e $S_2$ forem ordenados ou aleatórios. Assim, a ordem de ligação dos substratos e a ordem com que os produtos deixam o sítio ativo podem ser determinadas. Geralmente, o uso de um dos produtos da reação como inibidor é muito informativo. Se apenas um dos dois produtos da reação estiver presente, a reação inversa não ocorre. Entretanto, um produto geralmente liga-se a alguma parte do sítio ativo, agindo como um inibidor. Os enzimologistas podem fazer estudos cinéticos elaborados envolvendo diferentes combinações e quantidades de produtos e inibidores de modo a obterem um quadro detalhado do mecanismo de uma reação bissubstrato.

**PROBLEMA RESOLVIDO 6-3** **Efeito de inibidores sobre $K_m$**

Pesquisadores trabalhando com a enzima "felicidase" (ver Problemas Resolvidos 6-1 e 6-2, p. 205, 206) descobriram que o composto ESTRESSE é um potente inibidor competitivo da felicidase. A presença de ESTRESSE 1 nM aumenta o valor do $K_m$ medido da TRISTEZA por um fator de 2. Quais são os valores de $\alpha$ e $\alpha'$ nessas condições?

**Solução:** Relembre que o $K_m$ aparente, o $K_m$ medido na presença de um inibidor competitivo, é definido como $\alpha K_m$. Uma vez que o $K_m$ para TRISTEZA aumenta por um fator de 2 na presença de ESTRESSE 1 nM, o valor de $\alpha$ deve ser 2. O valor de $\alpha'$ para um inibidor competitivo, por definição, é 1.

**Inibição irreversível.** Os **inibidores irreversíveis** ligam-se covalentemente com ou destroem um grupo funcional da enzima essencial à atividade da enzima ou então formam uma associação não covalente estável. A formação de uma ligação covalente entre um inibidor irreversível e uma enzima é uma possibilidade. Os inibidores irreversíveis constituem-se em outra ferramenta útil para estudar mecanismos de reação. Algumas vezes, é possível identificar aminoácidos com funções-chave no sítio ativo determinando quais resíduos de aminoácidos se ligam covalentemente ao inibidor depois que a enzima é inativada. Um exemplo está mostrado na **Figura 6-16**.

Uma classe especial de inibidores irreversíveis é formada pelos **inativadores suicidas**. Esses compostos são relativamente não reativos até que se liguem ao sítio ativo de uma enzima específica. Um inativador suicida passa pelas primeiras etapas químicas de uma reação enzimática, mas em vez de ser transformado no produto normal, é convertido em um composto muito reativo que se combina irreversivelmente com a enzima. Esses compostos também são denominados **inativadores com base no mecanismo**, pois sequestram o mecanismo normal da reação para inativar a enzima. Os inativadores suicidas desempenham um papel significativo no *planejamento racional de fármacos*, uma abordagem moderna com base no conhecimento dos substratos e dos mecanismos de reação e usada pelos químicos para sintetizar novos agentes farmacêuticos. Um inativador suicida bem planejado é específico para uma única enzima e permanece sem reatividade até que se ligue no sítio ativo da enzima, de forma que os medicamentos desenvolvidos por meio dessa abordagem podem ter uma vantagem significativa devido aos poucos efeitos colaterais (ver Quadro 6-3). Alguns exemplos de inibidores de importância médica estão descritos no final da Seção 6.4.

Enzima —$CH_2$—OH + F—P(=O)(—O—CH($CH_3$)$_2$)—O—CH($CH_3$)$_2$ (Ser[195]) DIFP

→ $F^-$ + $H^+$

Enzima —$CH_2$—O—P(=O)(—O—CH($CH_3$)$_2$)—O—CH($CH_3$)$_2$

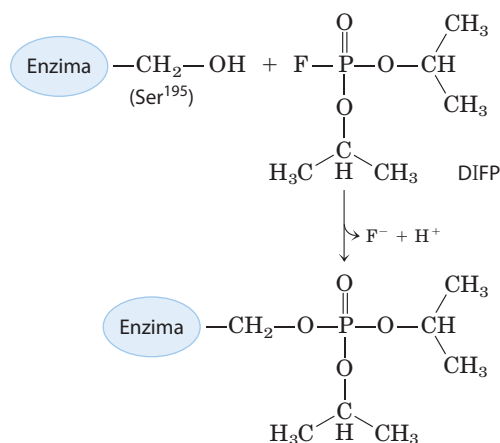



**FIGURA 6-16** **Inibição irreversível.** A reação da quimotripsina com di-isopropilfluorofosfato (DIFP), que modifica a Ser[195], inibe a enzima irreversivelmente. Isso levou à conclusão de que a Ser[195] é o resíduo de serina chave na quimotripsina.

Um inibidor irreversível não pode se ligar covalentemente à enzima. Ligação não covalente é suficiente, caso essa ligação for tão forte que o inibidor só se dissociará raramente. Como é que um inibidor que se ligue fortemente pode ser desenvolvido? Inicialmente, é importante lembrar que as enzimas evoluíram de modo a se ligarem mais firmemente ao estado de transição das reações que catalisam. Em princípio, se alguém puder planejar uma molécula que se pareça com o estado de transição da reação, essa molécula se ligará fortemente à enzima. Mesmo que os estados de transição não possam ser observados diretamente, químicos geralmente podem predizer a estrutura aproximada do estado de transição com base no acúmulo do conhecimento sobre os mecanismos da reação. O estado de transição é, por definição, transitório e tão instável que é impossível medir diretamente as interações de ligação entre essa espécie e a enzima. Em alguns casos, porém, é possível planejar moléculas estáveis que se assemelhem aos estados de transição. Essas moléculas são denominadas de **análogos do estado de transição**. Elas ligam-se à enzima mais fortemente do que o substrato no complexo ES porque elas se encaixam melhor no sítio ativo (i.e., formam um número maior de interações fracas) do que o próprio substrato. A ideia de análogos ao estado de transição foi proposta por Pauling na década de 1940 e vem sendo explorada usando algumas enzimas. Por exemplo, análogos ao estado de transição planejados para inibir a aldolase, enzima da via glicolítica, ligam-se à enzima com mais de quatro ordens de magnitude de firmeza do que os substratos (**Figura 6-17**). Esses experimentos têm a limitação que um análogo ao estado de transição não pode mimetizar perfeitamente um estado de transição. Alguns análogos, entretanto, ligam-se à enzima-alvo de $10^2$ a $10^8$ vezes mais fortemente que o substrato normal, fornecendo

## QUADRO 6-3  MEDICINA Cura da doença do sono com um cavalo de Troia bioquímico

A doença do sono, ou tripanossomíase africana, é causada por protistas (eucarionte unicelular) denominados de tripanossomos (Figura Q-1). Esta doença (e outras doenças causadas por tripanossomos) tem importância médica e econômica em muitos países em desenvolvimento. Até o recente século XX a doença era praticamente incurável. Vacinas eram ineficazes devido ao inusitado mecanismo de evasão ao sistema imune do hospedeiro.

A camada que reveste as células dos tripanossomos é coberta por uma única proteína que constitui o antígeno ao qual o sistema imune responde. Entretanto, por meio de um processo de recombinação genética (ver Tabela 28-1) a intervalos frequentes algumas células da população de tripanossomos infectantes mudam para uma nova proteína de revestimento a qual não é reconhecida pelo sistema imune. Esse processo de "mudança de revestimento" pode ocorrer centenas de vezes ao longo do tempo. O resultado é uma infecção crônica cíclica: a pessoa acometida tem febre que persiste enquanto o sistema imune ataca a primeira infecção; os tripanosomos com o revestimento alterado tornam-se a semente de uma segunda infecção e a febre volta. Esse ciclo pode se repetir por semanas e a pessoa enfraquece e pode vir a falecer.

Algumas das abordagens atuais para tratar a doença do sono baseiam-se no conhecimento da enzimologia e do metabolismo. Ao menos uma dessas abordagens envolve agentes farmacêuticos planejados como inibidores que atuam no mecanismo de inativadores de enzimas (inativadores suicidas). Um ponto vulnerável do metabolismo dos tripanossomatídeos é a via de biossíntese de poliaminas. As poliaminas espermina e espermidina, com papel na compactação do DNA, são necessárias em grandes quantidades por células em rápido crescimento. A primeira etapa da síntese dessas poliaminas é catalisada pela ornitina-descarboxilase, enzima que para funcionar necessita de uma coenzima denominada de piridoxal fosfato. O piridoxal fosfato (PLP), derivado da vitamina $B_6$, faz uma ligação covalente ao aminoácido substrato da reação em que está envolvido e age como um aceptor de elétrons, facilitando um grande número de reações (ver Figura 22-32). Nas células de mamífero, a ornitina-descarboxilase tem um alto *turnover*, isto é, ciclos de degradação e síntese da enzima. Em alguns tripanossomatídeos, porém, a enzima, por razões não bem conhecidas, é estável. Ela não é substituída por novas enzimas recém-sintetizadas. Um inibidor da ornitina-descarboxilase que se ligue permanentemente à enzima teria pouco efeito sobre as células humanas, já que elas repõem rapidamente a enzima inativada, mas teria um efeito adverso ao parasita.

**FIGURA Q-1** *Trypanosoma brucei rhodesiense*, um dos vários tripanossomatídeos que causam a doença do sono africana.

As primeiras etapas da reação normalmente catalisada pela ornitina-descarboxilase estão mostradas na Figura Q-2. Uma vez liberado o $CO_2$, o movimento de elétrons é revertido e a putrescina é produzida (ver Figura 22-32).

*(Continua na próxima página)*

Ornitina

$H_2N-(CH_2)_3-CH-COO^-$ / $NH_2$

Piridoxal fosfato

$H_2O$

Base de Schiff

$CO_2$

$H^+$

$H_2O$

Putrescina

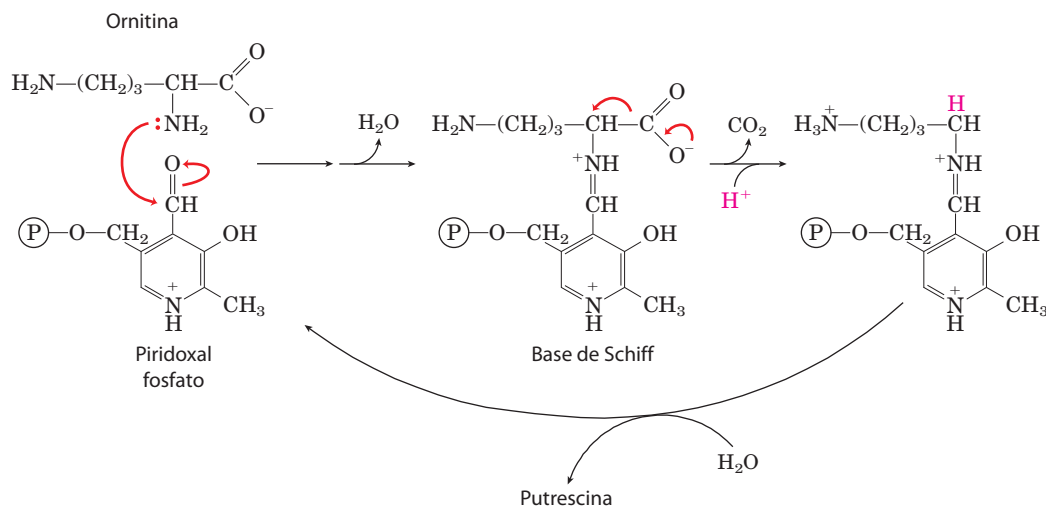



**FIGURA Q-2** Mecanismo da reação da ornitina-descarboxilase.

**QUADRO 6-3**  **MEDICINA** **Cura da doença do sono com um cavalo de Troia bioquímico (*Continuação*)**

Com base nesse mecanismo, foram planejados vários inativadores suicidas, um deles é a difluorometilornitina (DFMO). A DFMO é relativamente inerte em solução. Quando ela liga-se à ornitina-descarboxilase, a enzima é rapidamente inativada (Figura Q-3). O inibidor age proporcionando uma nova alternativa para receber os elétrons na forma dos dois átomos de flúor estrategicamente posicionados, que são excelentes grupos de saída. Em vez de fazer os elétrons se moverem para o anel da estrutura do PLP, a reação leva à liberação de um átomo de flúor. O S– de um resíduo de cisteína do sítio ativo forma então um complexo covalente com aduto altamente reativo do inibidor da PLP, uma reação essencialmente irreversível. Dessa maneira, o inibidor faz o próprio mecanismo de ação enzimática matar a enzima.

DFMO mostrou-se altamente eficaz contra a doença do sono em testes clínicos e agora é utilizado para tratar a doença do sono causada por *Trypanosoma brucei gambiense*. Abordagens como essa se revelam muito promissoras para tratar uma vasta gama de doenças. O planejamento de fármacos com base no mecanismo e na estrutura de enzimas pode complementar a metodologia tradicional de tentativa e erro no desenvolvimento de novos agentes farmacêuticos.

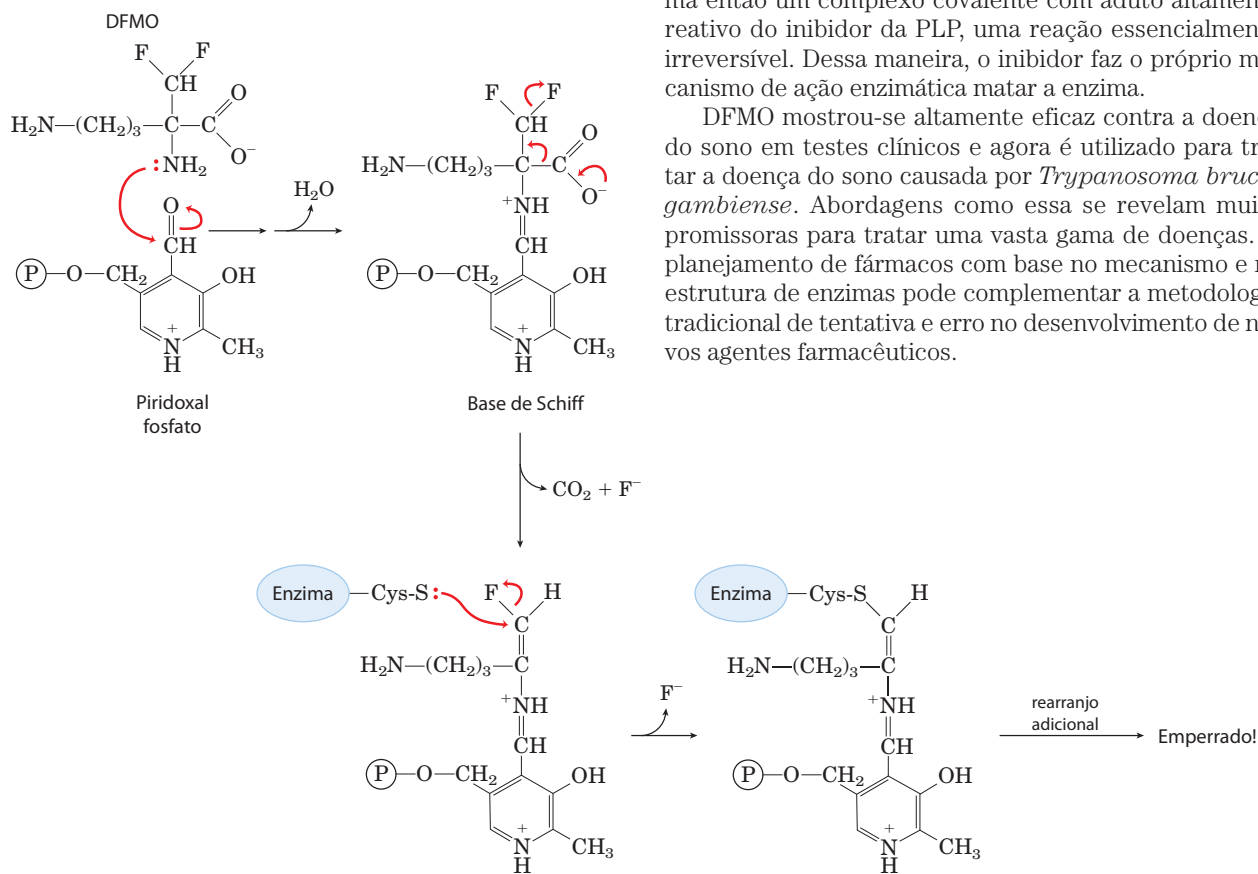



**FIGURA Q-3** Inibição da ornitina-descarboxilase por DFMO.

excelente evidência de que os sítios ativos das enzimas são realmente complementares aos estados de transição. O conceito de análogo ao estado de transição é importante para planejar novos fármacos. Como será visto adiante, os poderosos fármacos anti-HIV denominados de inibidores de proteases foram planejados, em parte, como análogos do estado de transição que se ligam fortemente.

## A atividade enzimática depende do pH

As enzimas têm um pH (ou uma faixa de pH) ótimo no qual a atividade catalítica é máxima (**Figura 6-18**); a atividade decresce em pH maior ou menor. Isso não surpreende. As cadeias laterais dos aminoácidos do sítio ativo podem funcionar como ácidos ou bases fracas em funções críticas que dependem da manutenção de certo estado de ionização, e em outras partes da proteína as cadeias laterais ionizáveis podem ter uma participação essencial nas interações que mantêm a estrutura proteica. A remoção de um próton de um resíduo de His, por exemplo, pode eliminar uma interação iônica essencial na estabilização da conformação ativa da enzima. Uma causa menos comum para a sensibilidade de uma enzima ao pH é a titulação de um grupo no substrato.

A faixa de pH na qual uma enzima sofre mudança na atividade pode fornecer uma pista para o tipo de resíduo de aminoácido envolvido (ver Tabela 3-1). Uma mudança de atividade próxima a pH 7,0, por exemplo, geralmente reflete a titulação de um resíduo de His. Contudo, os efeitos do pH devem ser interpretados com cautela. No ambiente altamente compacto e confinado das proteínas, os valores de p$K_a$ das cadeias laterais das proteínas podem estar alterados de modo significativo. Por exemplo, uma carga positiva que esteja próxima pode diminuir o p$K_a$ de um resíduo de Lys, e uma carga negativa nas proximidades pode aumentá-lo. Algumas vezes

Frutose 1,6-bifosfato

Gliceraldeído 3-fosfato

Estado de transição proposto

Análogo ao estado de transição, fosfoglicolo-hidroxamato

Di-hidroxiacetonafosfato

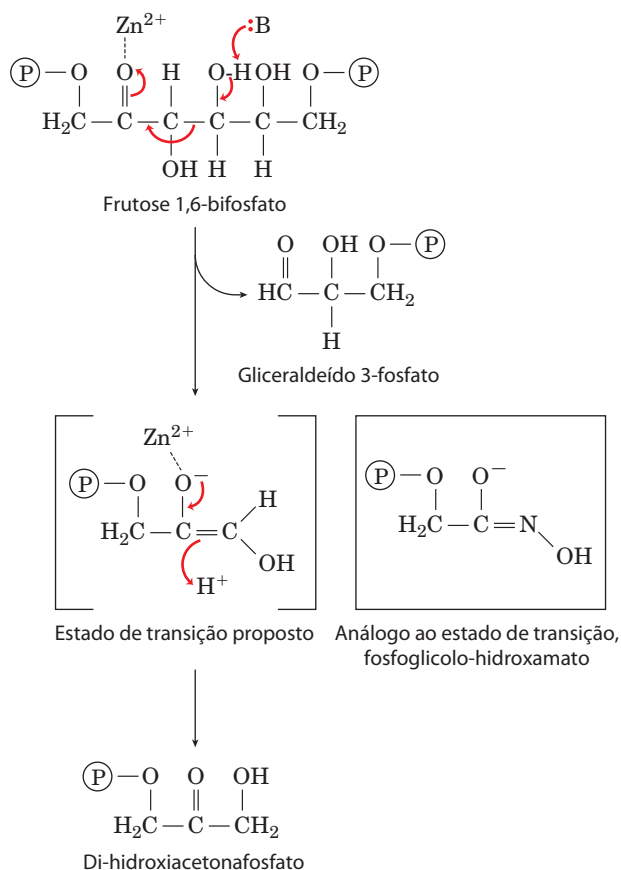



**FIGURA 6-17 Análogo do estado de transição.** Na glicólise, uma aldolase de classe II (encontrada em bactérias e fungos) catalisa a quebra da frutose 1,6-bifosfato, formando gliceraldeído-3-fosfato e fosfato de di-hidroxiacetona (ver Figura 14-16 para um exemplo de aldolase de classe I, encontrada em animais e plantas superiores). A reação ocorre como o reverso de um mecanismo do tipo de condensação aldólica. O composto fosfoglicolo-hidroxamato assemelha-se ao estado de transição do enodiolato proposto e liga-se à enzima aproximadamente 10.000 vezes melhor que o produto di-hidroxiacetonafosfato.

**FIGURA 6-18 Perfil de atividade em função do pH de duas enzimas.** As curvas foram construídas a partir de medidas das velocidades iniciais, e as reações foram feitas em tampões com pH diferentes. Uma vez que a escala de pH é logarítmica e representa mudanças de 10 vezes na $[H^+]$, as mudanças em $V_0$ também estão representadas no gráfico em escala logarítmica. O pH ótimo para a atividade de uma enzima geralmente é próximo ao pH do ambiente no qual a enzima costuma ser encontrada. A pepsina, peptidase encontrada no estômago, tem pH ótimo de cerca de 1,6. O pH do suco gástrico situa-se entre 1 e 2. A glicose-6-fosfatase dos hepatócitos (células do fígado), com pH ótimo de cerca de 7,8, é responsável pela liberação de glicose na corrente sanguínea. O pH normal do citosol dos hepatócitos é de cerca de 7,2.

esses efeitos resultam em um valor de p$K_a$ desviado várias ordens de grandeza do valor quando o aminoácido está livre. Por exemplo, na enzima acetoacetato-descarboxilase, devido aos efeitos eletrostáticos das cargas positivas presentes nas proximidades de um resíduo de Lys, esse resíduo de Lys tem p$K_a$ de 6,6 (comparado com 10,5 na lisina livre).

## RESUMO 6.3 A cinética enzimática como abordagem à compreensão do mecanismo

- A maioria das enzimas tem algumas propriedades cinéticas em comum. Quando o substrato é adicionado a uma enzima, a reação rapidamente atinge um estado estacionário no qual a velocidade pela qual o complexo ES se forma é compensada pela velocidade pela qual ES se decompõe. Em concentração fixa de enzima, à medida que a [S] aumenta, a atividade do estado estacionário aumenta de maneira hiperbólica até se aproximar de uma velocidade máxima característica, $V_{máx}$, na qual, essencialmente, toda a enzima está na forma de um complexo com o substrato.
- A concentração de substrato que resulta em uma velocidade de reação igual à metade da $V_{máx}$ é a constante de Michaelis, $K_m$, que é característica para cada enzima agindo sobre determinado substrato. A equação de Michaelis-Menten

$$V_0 = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + [S]}$$

relaciona a velocidade inicial com [S] e $V_{máx}$ por meio da constante $K_m$. A cinética de Michaelis-Menten também é denominada cinética do estado estacionário.
- $K_m$ e $V_m$ têm significados diferentes para diferentes enzimas. A velocidade limitante de uma reação catalisada por uma enzima, quando saturada, é descrita pela constante $k_{cat}$, o número de renovação. A relação $k_{cat}/K_m$ fornece uma boa medida da eficiência catalítica. A equação de Michaelis-Menten também é aplicável a reações de bissubstrato, nas quais ocorrem etapas com um complexo ternário, ou pingue-pongue (deslocamento duplo).
- A inibição reversível de uma enzima pode ser competitiva, incompetitiva ou mista. Inibidores competitivos competem com o substrato para se ligarem reversivelmente ao sítio ativo, mas não são transformados pela enzima. Inibidores incompetitivos ligam-se apenas ao complexo ES, em um sítio diferente do sítio ativo. Inibidores mistos ligam-se tanto a E quanto a ES, novamente em um sítio distinto do sítio ativo. Na inibição irreversível, o inibidor liga-se permanentemente ao sítio ativo pela formação de uma ligação covalente ou por uma interação não covalente muito estável.
- Cada enzima tem um pH ótimo (ou um intervalo de pH), no qual a atividade é máxima.

## 6.4 Exemplos de reações enzimáticas

Até agora o foco foi dirigido aos princípios gerais da catálise e à introdução de alguns dos parâmetros cinéticos usados para descrever a ação das enzimas. Agora a discussão será centrada em alguns exemplos de mecanismos específicos de reações enzimáticas.

A compreensão dos mecanismos completos da ação de enzimas purificadas requer a identificação de todos os substratos, cofatores, produtos e reguladores. Sobretudo, necessita do conhecimento (1) da sequência temporal na qual são formados os intermediários ligados à enzima, (2) da estrutura de cada intermediário e de cada estado de transição, (3) das velocidades da interconversão entre os intermediários, (4) da relação entre a estrutura da enzima e de cada intermediário e (5) da contribuição energética de todos os grupos reagentes que interagem com os complexos intermediários e com os estados de transição. Então, provavelmente não há enzima da qual se tenha um conhecimento que englobe todos esses requisitos.

A seguir, serão apresentados os mecanismos de quatro enzimas: quimotripsina, hexocinase, enolase e lisozima. Esses exemplos não foram escolhidos para cobrir todas as classes possíveis da química enzimática. Foram escolhidos, em parte, porque estão entre as enzimas sobre as quais mais se conhece e, em parte, porque ilustram com clareza alguns dos princípios gerais resumidos neste capítulo. A discussão se concentrará em princípios selecionados, juntamente com alguns experimentos-chave que contribuíram para estabelecer estes princípios. O exemplo da quimotripsina servirá para revisar a convenção usada para descrever os mecanismos enzimáticos. Necessariamente, muitos detalhes dos mecanismos e das evidências experimentais estão omitidos. Apenas um livro não poderia documentar por completo a rica história dos experimentos realizados com essas enzimas. Ainda, a contribuição especial das coenzimas para a atividade catalítica de muitas enzimas será vista apenas brevemente. As funções das coenzimas são quimicamente variadas e cada coenzima está descrita em detalhes na Parte II.

### O mecanismo da quimotripsina envolve a acilação e a desacilação de um resíduo de serina

A quimotripsina pancreática bovina ($M_r$ 25.191) é uma protease, enzima que catalisa a hidrólise de ligações peptídicas. Essa protease é específica para ligações peptídicas adjacentes a resíduos de aminoácidos aromáticos (Trp, Phe, Tyr). A estrutura tridimensional da quimotripsina está mostrada na **Figura 6-19**, enfatizando os grupos funcionais do sítio ativo. A reação catalisada por essa enzima é ilustrativa dos princípios da estabilização do estado de transição e também dá um exemplo clássico de catálise acidobásica e de catálise covalente.

A quimotripsina aumenta a velocidade da hidrólise da ligação peptídica por um fator de no mínimo $10^9$. Ela não catalisa um ataque direto da água à ligação peptídica; em vez disso, forma-se um intermediário acil-enzima covalente e transitório. Assim a reação tem duas fases distintas. Na fase de acilação, a ligação peptídica é rompida e há a formação de uma ligação éster entre o átomo de carbono da carbonila da ligação peptídica e a enzima. Na fase de desacilação, a ligação éster é hidrolisada e a enzima não acilada é regenerada.

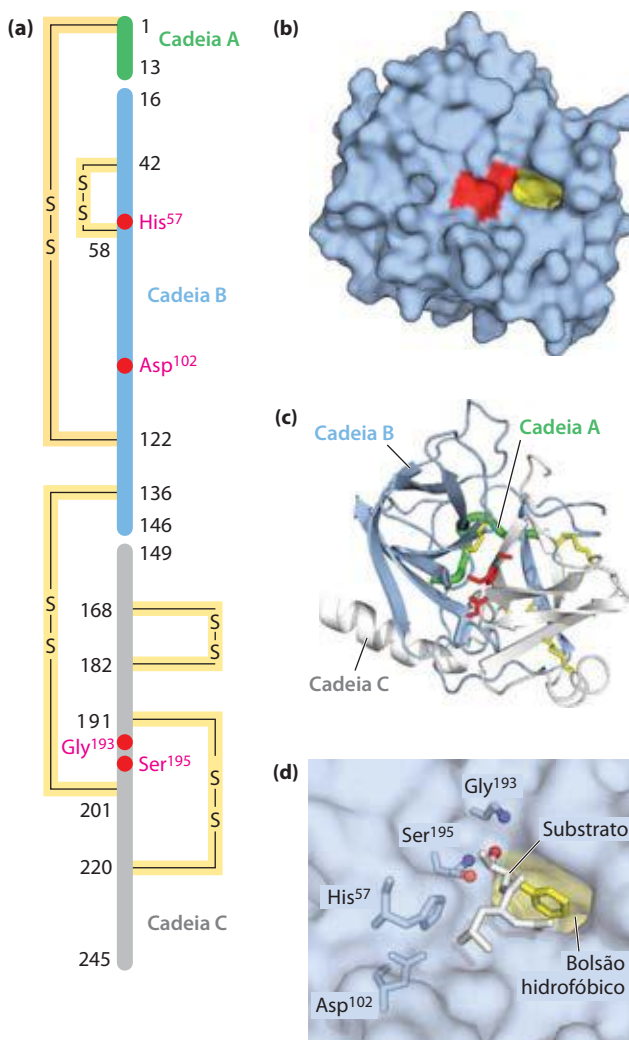



**FIGURA 6-19 Estrutura da quimotripsina.** (PDB 1D 7GCH) **(a)** Representação da estrutura primária, mostrando as ligações dissulfeto e os resíduos de aminoácidos cruciais para a catálise. A proteína consiste em três cadeias polipeptídicas ligadas por ligações dissulfeto. (A numeração dos resíduos na quimotripsina, com ausência dos resíduos 14, 15, 147 e 148, está explicada na Figura 6-38.) Os resíduos de aminoácidos do sítio ativo ficam agrupados na estrutura tridimensional. **(b)** Esquema da enzima enfatizando sua superfície. O bolsão hidrofóbico ao qual as cadeias laterais dos aminoácidos aromáticos do substrato se ligam está mostrado em amarelo. Resíduos-chave para o sítio ativo, incluindo $Ser^{195}$, $His^{57}$ e $Asp^{102}$, estão em vermelho. Os papéis desses resíduos na catálise estão ilustrados na Figura 6-22. **(c)** O esqueleto polipeptídico da estrutura está representado na forma de fita. As ligações dissulfeto estão em amarelo; as três cadeias estão coloridas como em (a). **(d)** Visão ampliada do sítio ativo da enzima com o substrato (branco e amarelo) ligado. O grupo hidroxila da $Ser^{195}$ ataca o grupo carbonil do substrato (os oxigênios estão em vermelho). A carga negativa que se desenvolve nos oxigênios é estabilizada pelo bolsão do oxiânion (nitrogênios das amidas da $Ser^{195}$ e da $Gly^{193}$ estão em azul), como explicado na Figura 6-22. As cadeias laterais dos aminoácidos aromáticos do substrato (amarelo) encaixam-se no bolsão hidrofóbico. O nitrogênio da amida da ligação peptídica a ser clivada (protuberante em relação ao observador e projetando-se para o resto da cadeia do substrato polipeptídico) está em branco.

A primeira evidência de um intermediário acil-enzima covalente veio da aplicação clássica da cinética de estado

pré-estacionário. Além da sua ação sobre peptídeos, a quimotripsina também catalisa a hidrólise de pequenos ésteres e amidas. Essas reações são muito mais lentas que a hidrólise de peptídeos porque, no caso de substratos pequenos, menos energia de ligação está disponível, e assim essas reações são mais fáceis de estudar. Investigações realizadas por B.S. Hartley e B.A. Kilby em 1954 revelaram que a hidrólise do éster *p*-nitrofenilacetato pela tripsina, medida pela liberação de *p*-nitrofenol, ocorre com uma fase de explosão rápida inicial antes de nivelar a uma velocidade menor (**Figura 6-20**). Extrapolando para o tempo zero, eles concluíram que a fase explosiva correspondia justamente à liberação de uma molécula de *p*-nitrofenol por molécula de enzima presente. Hartley e Kilby sugeriram que isso seria o reflexo da rápida acilação de todas as moléculas de enzima (com a liberação de *p*-nitrofenol) e a velocidade de renovação do ciclo de catálise da enzima sendo limitada por uma etapa de desacilação lenta. Desde então, resultados semelhantes foram encontrados para muitas outras enzimas. A observação da fase explosiva fornece outro exemplo do uso da cinética para separar uma reação em suas etapas constituintes.

Outras características do mecanismo da quimotripsina foram descobertas pela análise da dependência da reação ao pH. A relação entre a velocidade da reação catalisada pela quimotripsina e a variação do pH mostra um perfil em forma de sino (**Figura 6-21**). As velocidades mostradas no gráfico da Figura 6-21a são obtidas em baixas (subsaturantes) concentrações de substrato e, portanto, representam $k_{cat}/K_m$ (ver Equação 6-27, p. 205). Uma análise mais completa das velocidades a diferentes concentrações de substrato em cada pH permite que o pesquisador determine a contribuição individual dos termos $k_{cat}$ e $K_m$ (Figura 6-21b). Depois de obter o valor de $K_m$ em cada valor de pH, os pesquisadores podem fazer um gráfico usando os dados de $1/K_m$ (Figura 6-21c). Análises cinéticas e estruturais revelaram que as mudanças no $k_{cat}$ refletem o estado de ionização da His[57]. A diminuição no $k_{cat}$ que ocorre em pH baixo é resultado da protonação da His[57] (assim ela não pode tirar um próton da Ser[195] na etapa ❷ da reação; ver **Figura 6-22**). Essa redu-

**FIGURA 6-20 Evidência de um intermediário acil-enzima fornecida pela cinética do estado pré-estacionário.** A hidrólise de *p*-nitrofenilacetato pela quimotripsina é medida pela liberação de *p*-nitrofenol (um produto colorido). Inicialmente, a reação libera *p*-nitrofenol de maneira muito rápida e próxima da estequiometria com a quantidade da enzima presente. Isso reflete a rápida fase de acilação da enzima. A velocidade subsequente é menor porque a renovação da enzima é limitada pela baixa velocidade da fase de desacilação.

**FIGURA 6-21 A dependência de pH da reação catalisada pela quimotripsina. (a)** As relações entre velocidades da clivagem catalisada pela quimotripsina e o pH produzem uma curva de velocidade com um perfil na forma de sino e com um pH ótimo de 8,0. A velocidade (*v*) colocada no gráfico é a velocidade em baixas concentrações de substrato e, assim, reflete o termo $k_{cat}/K_m$. O gráfico pode ser então separado nos seus componentes por meio de métodos cinéticos que determinam os termos $k_{cat}$ e $K_m$ separadamente em cada pH. Quando isso é feito **(b** e **c)**, fica claro que a transição logo acima de pH 7,0 deve-se a mudanças no $k_{cat}$, ao passo que a transição acima de pH 8,5 deve-se a mudanças em $1/K_m$. Estudos cinéticos e estruturais mostraram que a transição ilustrada em (b) e (c) reflete os estados de ionização da cadeia lateral da His[57] (quando o substrato não está ligado) e o grupo $\alpha$-amino da Ile[16] (o amino terminal da cadeia B), respectivamente. Para uma atividade ótima, a His[57] deve estar desprotonada e a Ile[16] deve estar protonada.

### Como interpretar mecanismos de reações – Reavivar a memória

Os mecanismos das reações químicas, que rastreiam a formação e a quebra de ligações covalentes, são apresentados com pontos e flechas curvas, uma convenção informalmente conhecida como “empurrão de elétrons”. Uma ligação covalente consiste em um par de elétrons compartilhado. Elétrons não pertencentes à ligação e importantes para o mecanismo de reação são representados por pontos (–ÖH). Setas curvas (⌒) representam o movimento dos pares de elétrons. Para o movimento de apenas um elétron (como no caso da reação de um radical livre) usa-se uma flecha com só uma ponta (tipo anzol) (⌒). A maioria das reações envolve um par de elétrons (como no mecanismo da quimotripsina).

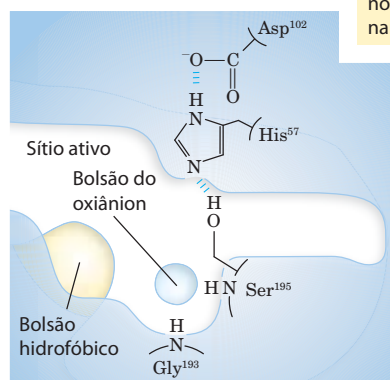
Alguns átomos são mais eletronegativos que outros, isto é, eles atraem elétrons mais fortemente. As eletronegatividades relativas dos átomos encontrados neste texto são Fe > O > N > C≈S > P≈H. Por exemplo, o compartilhamento dos dois pares de elétrons que formam a ligação do grupo C═O (carbonil) não é equitativo; o carbono é relativamente elétron-deficiente, pois o oxigênio atrai mais os elétrons. Muitas reações envolvem a reação de um átomo rico em elétrons (nucleófilo) com um átomo elétron-deficiente (eletrófilo). Alguns dos nucleófilos e eletrófilos mais comuns na bioquímica estão listados à direita.

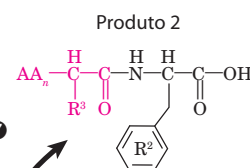
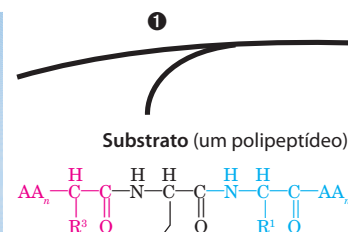
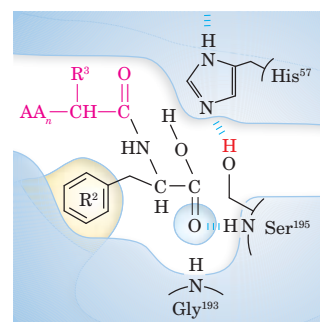
Geralmente, o mecanismo de uma reação inicia-se em um par de elétrons não compartilhados de um nucleófilo. Nos diagramas de mecanismos, a flecha que mostra o empurrão de elétrons começa perto dos pontos que indicam o par de elétrons e aponta diretamente para o centro eletrofílico que é atacado. Quando o par de elétrons não compartilhados confere uma carga negativa formal ao nucleófilo, o próprio símbolo de carga negativa pode representar o par de elétrons não compartilhado e serve de início para a flecha. No mecanismo da quimotripsina, o par de elétrons nucleofílicos do complexo ES entre as etapas ❶ e ❷ é fornecido pelo oxigênio do grupo hidroxila da $Ser^{195}$. O começo da flecha curva é nesse par de elétrons (2 das 8 valências de elétrons do oxigênio da hidroxila). O centro eletrofílico sob ataque é o carbono carbonílico da ligação peptídica a ser clivada. Os átomos de C, O e N tem um máximo de 8 elétrons de valência, e o H tem um máximo de 2. Esses átomos, ocasionalmente, são encontrados em um estado instável com um número menor de elétrons que o máximo possível, mas C, O e N não podem ter mais do que 8. Então, quando um par de elétrons da $Ser^{195}$ da tripsina ataca o carbono do carbonil do substrato, um par de elétrons é deslocado da camada de valência do carbono (não pode haver carbono com 5 ligações!). Esses elétrons movem-se na direção do oxigênio do carbonil que é mais eletronegativo. O oxigênio tem 8 elétrons de valência, tanto antes como no final desse processo químico, mas o número de elétrons compartilhado com o carbono é reduzido de 4 para 2, e o oxigênio do carbonil adquire uma carga negativa. Na etapa seguinte, o par de elétrons que confere carga negativa ao oxigênio retorna para formar novamente a ligação com o carbono e reestabelecer a ligação carbonílica. Novamente, um par de elétrons deve ser deslocado do carbono, e agora esse par é o par de elétrons compartilhado com o grupo amino da ligação peptídica. Isso quebra a ligação peptídica. As etapas seguintes adotam um padrão semelhante.

**Quimotripsina** (enzima livre)

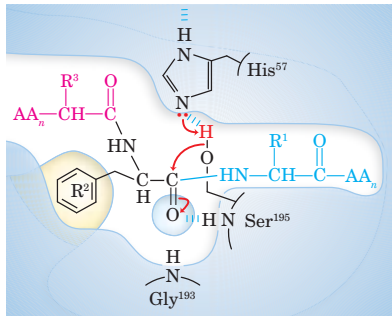
Sítio ativo

Bolsão do oxiânion

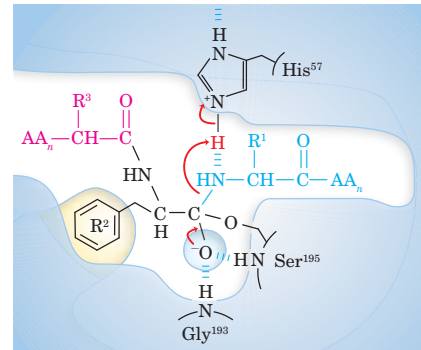
Bolsão hidrofóbico

Quando ocorre a ligação de um substrato, a cadeia lateral do resíduo adjacente à ligação peptídica a ser clivada aninha-se no bolsão hidrofóbico da enzima, posicionando a ligação peptídica para o ataque.

❶

O segundo produto difunde-se do sítio ativo e a enzima livre é regenerada.

| Nucleófilos | Eletrófilos |
|---|---|
| Oxigênio carregado negativamente (como no grupo hidroxila desprotonado ou em um ácido carboxílico ionizado) | Átomo de carbono de um grupo carbonil (o oxigênio mais eletronegativo do grupo carbonil empurra os elétrons para longe do carbono) |
|  Sulfidril negativamente carregado | O grupo imina protonado (ativado por um ataque nucleofílico ao carbono pela protonação de uma imina) |
| Carbânion |  Fósforo de um grupo fosfato |
| Grupo amina não carregado | Próton |
|  Imidazol | |
| Íon hidróxido | |

**Complexo ES**

A interação entre a Ser[195] e a His[57] origina um íon alcóxido fortemente nucleofílico na Ser[195]; o íon ataca o grupo carbonil peptídico, formando uma acil-enzima tetraédrica. Isso é acompanhado pela formação de uma carga negativa de vida curta no oxigênio do carbonil do substrato, que é estabilizado pela ligação de hidrogênio no bolsão do oxiânion.

❷

**Intermediário* de vida curta** (acilação)

A instabilidade da carga negativa no oxigênio do carbonil do substrato leva ao colapso do intermediário tetraédrico; a formação novamente de ligação dupla com o carbono desloca a ligação entre o carbono e o grupo amino da ligação peptídica. O grupo amino de saída é protonado pela His[57], facilitando o seu deslocamento.

Produto 1

❸

**MECANISMO-FIGURA 6-22 Hidrólise de uma ligação peptídica pela quimotripsina.** A reação tem duas fases. Na fase de acilação (etapas ❶ a ❹), a formação de um intermediário covalente acil-enzima é acoplada à clivagem da ligação peptídica. Na fase de desacilação (etapas ❺ a ❼), a desacilação regenera a enzima livre. Isso é essencialmente o reverso da fase de acilação, com a água tendo, no sentido oposto, o papel do componente amino do substrato. **Mecanismo da quimotripsina**

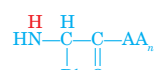
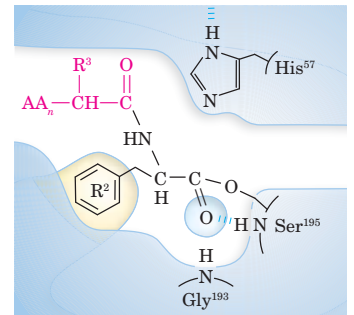
*O intermediário tetraédrico na reação da quimotripsina e o segundo intermediário formado posteriormente algumas vezes são chamados de estados de transição, o que pode gerar confusão. Um *intermediário* é qualquer espécie química com um tempo de vida finito, "tempo de vida" sendo definido como um tempo maior do que o tempo da vibração molecular (~$10^{-13}$ segundos). Um *estado de transição* é simplesmente a espécie de maior energia formada durante a coordenada da reação, não tendo um tempo de vida finito. Os intermediários tetraédricos formados na reação da quimotripsina lembram perfeitamente, tanto energética como estruturalmente, os estados de transição que levam à sua formação e rompimento. Entretanto, o intermediário representa um estágio de comprometimento com a formação da ligação, enquanto o estado de transição é parte do processo da reação. No caso da quimotripsina, devido à estreita relação entre o intermediário e o verdadeiro estado de transição, a diferenciação entre eles normalmente é desconsiderada. Além disso, a interação do oxigênio negativamente carregado com os nitrogênios da amida no bolsão do oxiânion, geralmente considerado como estabilização do estado de transição, também serve para estabilizar o intermediário. Nem todos os intermediários têm uma vida tão curta para parecer um estado de transição. O intermediário acil-enzima da quimotripsina é muito mais estável e mais facilmente detectado e estudado, não deve ser confundido com o estado de transição.

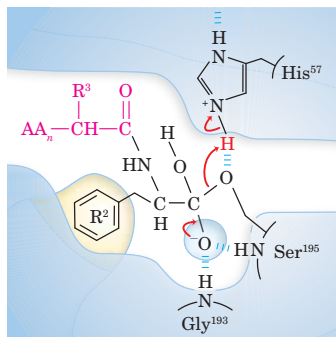
**Intermediário acil-enzima**

❹

**Intermediário acil-enzima**

A molécula de água que entra é desprotonada por catálise básica geral, gerando um íon hidróxido fortemente nucleofílico. O ataque do hidróxido à ligação éster da acil-enzima gera um segundo intermediário tetraédrico, e o oxigênio no bolsão do oxiânion novamente adquire uma carga negativa.

❺

**Intermediário* de vida curta** (desacilação)

❻

O colapso do intermediário tetraédrico forma o segundo produto, um ânion carboxilato, e desloca a Ser[195].

ção na velocidade ilustra a importância da catálise geral acidobásica no mecanismo da quimotripsina. As mudanças no termo $1/K_m$ refletem a ionização do grupo $\alpha$-amino da Ile[16] (na extremidade aminoterminal de uma das três cadeias polipeptídicas da quimotripsina). Esse grupo forma uma ponte salina com o Asp[194], o que estabiliza a conformação ativa da enzima. Quando esse grupo perde seu próton em pH alto, a ponte salina é eliminada e a mudança conformacional fecha o bolsão hidrofóbico onde a cadeia lateral do aminoácido aromático do substrato se encaixa (Figura 6-19). Os substratos já não podem mais se ligar de modo apropriado, o que é medido cineticamente pelo aumento no $K_m$.

Como pode ser visto na Figura 6-22, o nucleófilo da fase de acilação é o oxigênio da Ser[195]. (Proteases com um resíduo de serina desempenhando esse papel no mecanismo de reação são denominadas **serino-proteases**.) O p$K_a$ do grupo hidroxila da Ser geralmente é muito alto para que, em pH fisiológico, a forma não protonada esteja presente em concentrações significativas. Entretanto, na quimotripsina, a Ser[195] está associada a His[57] e Asp[102] por meio de uma rede de ligações de hidrogênio conhecida como **tríade catalítica**. Quando um substrato peptídico liga-se à quimotripsina, uma mudança sutil na conformação comprime a ligação de hidrogênio entre His[57] e Asp[102], o que resulta em uma interação mais forte, denominada ligação de hidrogênio de baixa barreira. Essa interação mais forte aumenta o p$K_a$ da His[57] de ~7 (no caso da histidina livre) para > 12, possibilitando que o resíduo de His atue como uma base geral mais forte que pode remover o próton do grupo hidroxila da Ser[195]. A desprotonação evita o aparecimento de uma carga positiva muito instável na hidroxila da Ser[195] e torna a cadeia lateral da Ser um nucleófilo forte. Nos estágios finais da reação, a His[57] também age como um doador de próton, protonando o grupo amino que é liberado (o grupo de saída) do substrato.

À medida que o oxigênio da Ser[195] ataca o grupo carbonil do substrato, um intermediário tetraédrico* de vida muito curta se forma, e o oxigênio do carbonil adquire uma carga negativa (Figura 6-22, etapa ❷). Essa carga, formada no interior de um bolsão da enzima denominado bolsão do oxiânion, é estabilizada pelas ligações de hidrogênio formadas pelos grupos amida de duas ligações peptídicas do esqueleto de carbono da quimotripsina. Uma dessas ligações de hidrogênio (formada pela Gly[193]) está presente apenas nesse intermediário e no estado de transição para sua formação e quebra. Ela reduz a energia necessária para atingir esses estágios. Esse é um exemplo de uso de energia de ligação para a catálise.

## O conhecimento do mecanismo das proteases levou a novos tratamentos para infecções por HIV

Novos agentes farmacêuticos quase sempre são feitos para inibir alguma enzima. O grande sucesso de terapias desenvolvidas para tratar infecções por HIV evidencia isso. O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o agente que causa a síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids). Estima-se que no mundo todo, em 2005, de 37 a 45 milhões de pessoas viviam com infecção por HIV, com 3,9 a 6,6 milhões de novas infecções naquele ano e mais de 2,4 milhões de óbitos. A Aids apareceu inicialmente como uma epidemia mundial na década de 1980. Logo em seguida o HIV foi descoberto e identificado como um **retrovírus**. Os retrovírus possuem um genoma de RNA e uma enzima, transcriptase reversa, que utiliza diretamente RNA para fazer a síntese de um DNA complementar. Os esforços para entender o HIV e desenvolver terapias para a infecção por HIV se beneficiaram de décadas de pesquisa básica, tanto sobre mecanismos de enzimas quanto sobre as propriedades de outros retrovírus. Retrovírus como o HIV tem um ciclo de vida relativamente simples (ver Figura 26-32). O seu genoma de RNA é convertido em fita dupla de DNA em várias etapas catalisadas pela transcriptase reversa (descrita no Capítulo 26). A fita dupla de DNA é inserida em um dos cromossomas do núcleo da célula hospedeira por uma enzima, a integrase (descrita no Capítulo 25). A cópia do genoma viral integrada no cromossomo pode ficar silenciosa indefinidamente. Alternativamente, ela pode ser transcrita novamente em RNA, o qual pode então ser traduzido em proteínas para formar novas partículas virais. A maior parte dos genes de vírus é traduzida em grandes poliproteínas que são quebradas pela protease do vírus nas proteínas individuais necessárias para formar o vírus (ver Figura 26-33). Há apenas três enzimas críticas nesse ciclo: transcriptase reversa, integrase e protease. Essas enzimas constituem, portanto, os alvos de fármacos mais promissores.

Existem quatro subclasses principais de proteases. Serino-proteases, como a quimotripsina e a tripsina, cisteína-proteases (nas quais Cys tem um papel catalítico similar ao da Ser no sítio ativo) formando um complexo covalente enzima-substrato e aspártico-proteases e metaloproteases que não formam complexo covalente com o substrato. A protease do HIV é uma aspártico-protease. Dois resíduos de Asp no sítio ativo facilitam um ataque direto da água sobre a ligação peptídica a ser clivada (**Figura 6-23**). O produto inicial do ataque da água sobre o grupo carbonil da ligação peptídica é um intermediário tetraédrico instável, à semelhança do que foi visto na reação da quimotripsina. Esse intermediário se assemelha em estrutura e energia ao estado de transição da reação. Os fármacos que foram desenvolvidos como inibidores da protease do HIV formam complexos não covalentes com a enzima, mas eles se ligam à enzima tão fortemente que podem ser considerados como inibidores irreversíveis. Essa ligação tão forte deriva, em parte, da sua estrutura planejada para ser análoga ao estado de transição. O sucesso desses fármacos é uma questão que merece ser enfatizada. Os princípios catalíticos que foram estudados nesse capítulo não são simplesmente ideias abstratas a serem memorizadas: suas aplicações salvam vidas.

A protease do HIV cliva ligações peptídicas entre resíduos de Phe e Pro com mais eficiência. O sítio ativo, então, tem um bolsão para ligar grupos de aminoácidos aromáticos próximos à ligação a ser clivada. Estruturas de vários inibidores da protease do HIV estão mostradas na **Figura 6-24**. Embora pareça que há variação entre as estruturas, todas elas têm uma estrutura central, uma cadeia principal com um grupo hidroxila posicionado próximo a uma ramificação contendo um grupo benzil. Essa organização visa o grupo benzil do bolsão de ligação aromático (hidrofóbico). O grupo benzil adjacente mimetiza o oxigênio negativamente carregado do intermediário tetraédrico da reação normal, fornecendo um análogo do estado de transição. O restan-

Auxiliada por catálise geral básica, a água ataca o carbono do carbonil, gerando um intermediário tetraédrico estabilizado por ligação de hidrogênio.

O intermediário tetraédrico colapsa, e o grupo amino de saída é protonado e expelido.

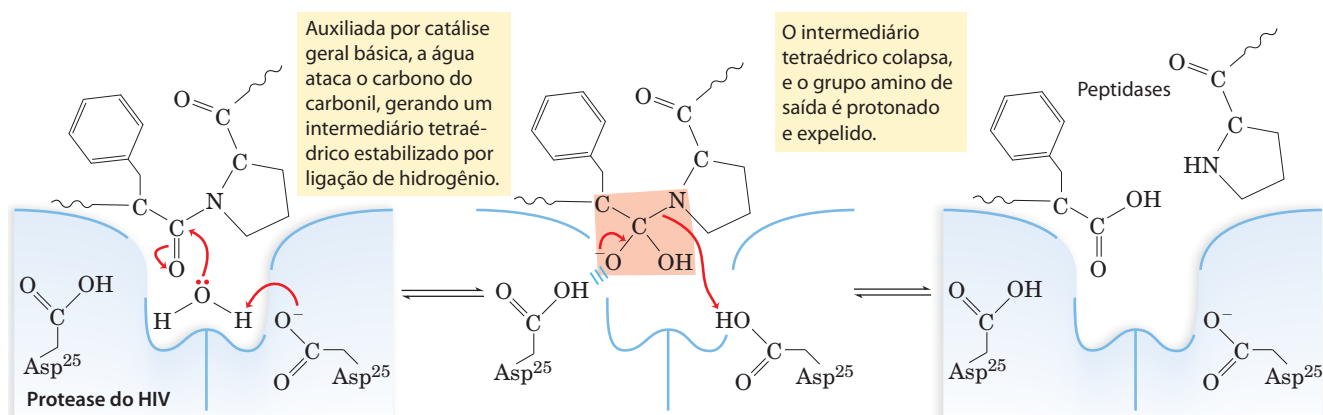
Peptidases

Protease do HIV

**FIGURA 6-23 Mecanismo de ação da protease do HIV.** Dois resíduos de Asp do sítio ativo (de diferentes subunidades) agem como catalisador geral acidobásico facilitando o ataque da água sobre a ligação peptídica. O intermediário tetraédrico instável formado no curso da reação está sombreado em cor salmão.

Indinavir

Nelinavir

Lopinavir

Saquinavir

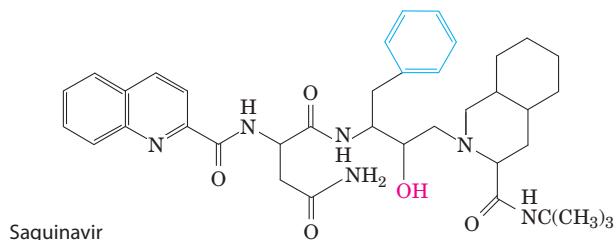
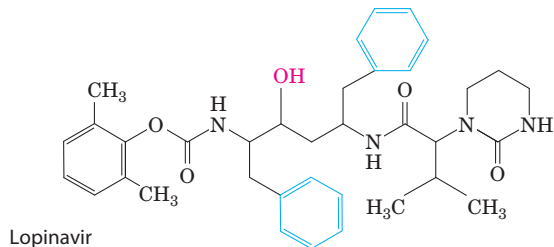
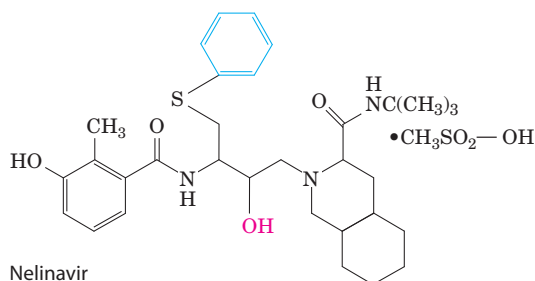
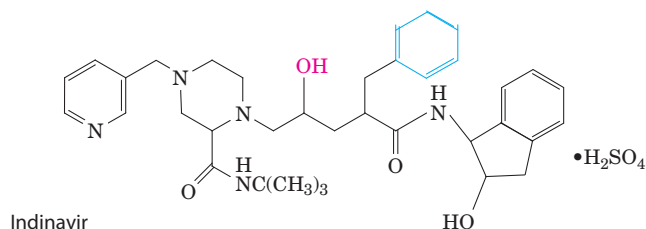
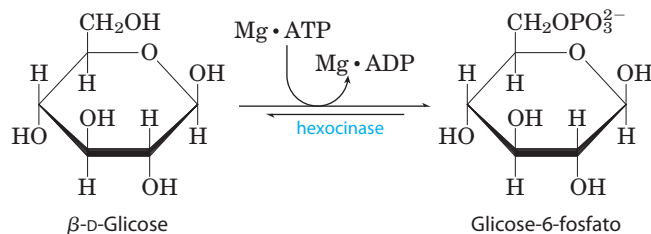



**FIGURA 6-24 Inibidores da protease do HIV.** O grupo hidroxila (cor-de-rosa) age como análogo do estado de transição mimetizando o intermediário tetraédrico. O grupo benzil adjacente (azul) ajuda a posicionar o fármaco apropriadamente.

te da estrutura de cada inibidor foi planejado para ligar a várias cavidades ao longo da enzima, reforçando a ligação total. A disponibilidade desses fármacos eficazes aumentou enormemente o tempo e a qualidade de vida de milhões de pessoas com HIV e Aids. ■

## A hexocinase sofre um ajuste induzido quando o substrato se liga

A hexocinase de levedura ($M_r$ 107.862) é uma enzima bissubstrato que catalisa a reação reversível

β-D-Glicose + Mg · ATP ⇌ (hexocinase) Glicose-6-fosfato + Mg · ADP

ATP e ADP sempre se ligam às enzimas em complexo com o íon metálico $Mg^{2+}$.

A hidroxila no C-6 da glicose (para onde o grupo γ-fosforil do ATP é transferido na reação da hexocinase) é similar à água em reatividade química, e a água entra livremente no sítio ativo da enzima. Assim, a hexocinase favorece a reação com a glicose por um fator de $10^6$. A enzima consegue diferenciar as moléculas de glicose e de água devido a uma mudança conformacional na enzima que acontece quando o substrato correto se liga ao sítio ativo (**Figura 6-25**). Portanto, a hexocinase é um bom exemplo de ajuste induzido. Na ausência de glicose, a enzima fica na conformação inativa, com as cadeias laterais dos aminoácidos do sítio ativo fora de posição para a reação. Quando glicose (mas não água) e Mg · ATP se ligam, a energia de ligação decorrente desta interação induz mudança conformacional na hexocinase para a forma cataliticamente ativa.

Esse modelo foi corroborado por estudos cinéticos. O açúcar de cinco carbonos xilose, estereoquimicamente similar à glicose, mas com um carbono a menos, liga-se à hexocinase, embora em uma posição na qual ele não pode ser

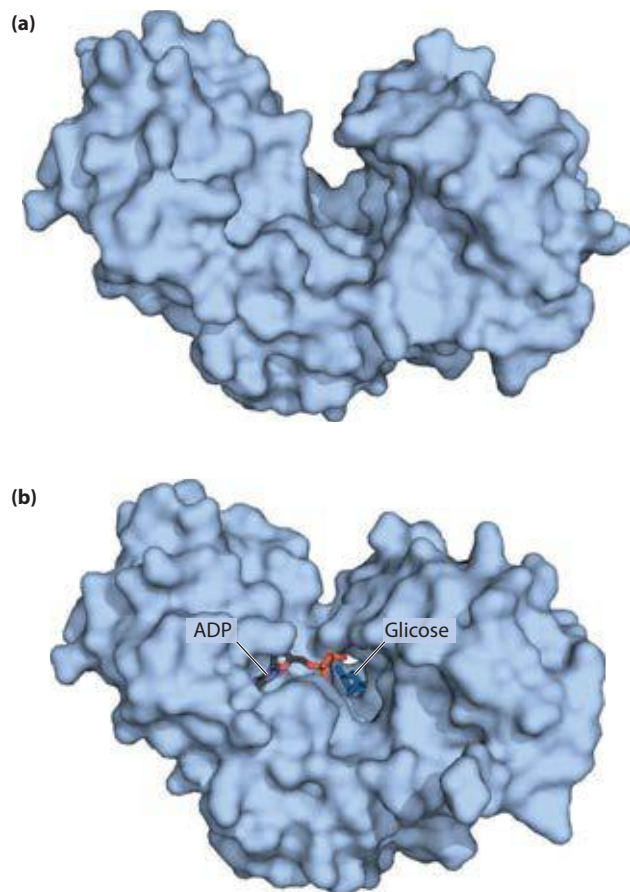
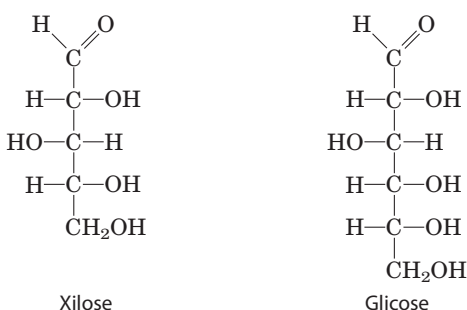



**FIGURA 6-25 Ajuste induzido da hexocinase. (a)** A hexocinase tem uma estrutura em forma de U (PDB ID 2YHX). **(b)** As extremidades aproximam-se uma da outra em uma mudança conformacional induzida pela ligação de D-glicose (derivado de PDB ID 1HKG e PDB ID 1GLK).

fosforilado. Apesar disso, a adição de xilose à mistura de reação aumenta a velocidade da hidrólise de ATP. Evidentemente, a ligação da xilose é suficiente para induzir uma mudança na hexocinase para a conformação ativa, e a enzima é "enganada" para fosforilar água. A reação da hexocinase também ilustra que a especificidade da enzima nem sempre é uma simples questão de ligar um composto e não outro. No caso da hexocinase, a especificidade é observada não para a formação do complexo ES, mas para as velocidades relativas das etapas seguintes da catálise. A água não é excluída do sítio ativo, mas as velocidades de reação aumentam muito na presença de um aceptor de grupo fosforil funcional (a glicose).

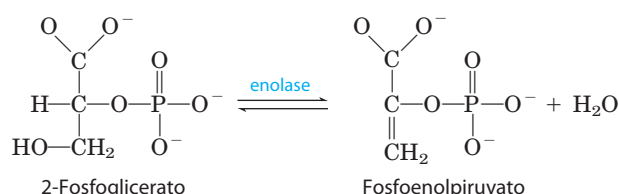
$$\begin{array}{c} \mathrm{H{-}C{=}O} \\ | \\ \mathrm{H{-}C{-}OH} \\ | \\ \mathrm{HO{-}C{-}H} \\ | \\ \mathrm{H{-}C{-}OH} \\ | \\ \mathrm{CH_2OH} \end{array} \qquad \begin{array}{c} \mathrm{H{-}C{=}O} \\ | \\ \mathrm{H{-}C{-}OH} \\ | \\ \mathrm{HO{-}C{-}H} \\ | \\ \mathrm{H{-}C{-}OH} \\ | \\ \mathrm{H{-}C{-}OH} \\ | \\ \mathrm{CH_2OH} \end{array}$$

Xilose Glicose

O ajuste induzido é apenas um aspecto do mecanismo da hexocinase. Assim como a quimotripsina, a hexocinase utiliza várias estratégias catalíticas. Por exemplo, os resíduos de aminoácidos do sítio ativo (aqueles trazidos para a posição correta na mudança conformacional decorrente da ligação do substrato) participam de catálise geral acidobásica e da estabilização do estado de transição.

## O mecanismo de reação da enolase requer a presença de íons metálicos

Outra enzima glicolítica, a enolase, catalisa a desidratação reversível de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato:

$$\begin{array}{c} \mathrm{O \;\; O^-} \\ \backslash\,/ \\ \mathrm{C} \\ | \\ \mathrm{H{-}C{-}O{-}PO_3^{2-}} \\ | \\ \mathrm{HO{-}CH_2} \end{array} \underset{}{\overset{\text{enolase}}{\rightleftharpoons}} \begin{array}{c} \mathrm{O \;\; O^-} \\ \backslash\,/ \\ \mathrm{C} \\ | \\ \mathrm{C{-}O{-}PO_3^{2-}} \\ \| \\ \mathrm{CH_2} \end{array} + \mathrm{H_2O}$$

2-Fosfoglicerato Fosfoenolpiruvato

Essa reação é um exemplo do uso de um cofator enzimático, neste caso um íon metálico (um exemplo da função coenzima foi dado no Quadro 6-3). A enolase de levedura ($M_r$ 93.316) é um dímero com 436 resíduos de aminoácidos em cada subunidade. A reação da enolase ilustra um tipo de catálise por íon metálico e serve de exemplo de catálise geral acidobásica e de estabilização do estado de transição. A reação ocorre em duas etapas (**Figura 6-26a**). Primeiro, a $Lys^{345}$ age como catalisador geral acidobásico, tirando um próton do C-2 do 2-fosfoglicerato. Então, o $Glu^{211}$ age como um catalisador geral acidobásico, doando um próton para o grupo de saída (—OH). O próton do C-2 do fosfoglicerato não é muito ácido e, portanto, não pode ser removido facilmente. Entretanto, no sítio ativo, o 2-fosfoglicerato sofre interações iônicas fortes com dois íons $Mg^{2+}$ que estão ligados (Figura 6-26b), aumentando fortemente a retirada de elétrons pelo carbonil. Em conjunto, esses efeitos fornecem aos prótons em C-2 uma acidez suficiente (baixando o $pK_a$) de modo que um dos elétrons pode ser abstraído para iniciar a reação. À medida que o intermediário enolato instável se forma, os íons metálicos agem como um escudo que protege as duas cargas negativas (nos átomos de oxigênio do carbonil) que existem transitoriamente com muita proximidade entre si. Ligações de hidrogênio com outros resíduos de aminoácidos do sítio ativo também contribuem para o mecanismo como um todo. As várias interações estabilizam efetivamente tanto o intermediário enolato quanto o estado de transição que antecede a sua formação.

## A lisozima utiliza duas reações sucessivas de deslocamento nucleofílico

A lisozima é um agente antibacteriano natural encontrado em lágrimas e na clara de ovo. A lisozima da clara de ovo ($M_r$ 14.296) é um monômero com 129 resíduos de aminoácidos. Foi a primeira enzima a ter a estrutura tridimensional determinada, por David Phillips e colegas em 1965. A estrutura revelou a existência de quatro ligações

**MECANISMO-FIGURA 6-26 Reação de duas etapas catalisada pela enolase. (a)** O mecanismo pelo qual a enolase converte 2-fosfoglicerato (2-PGA) em fosfoenolpiruvato. O grupo carboxil do 2-PGA é coordenado no sítio ativo por dois íons magnésio. **(b)** Relações entre o substrato, 2-PGA, com $Lys^{345}$, $Glu^{211}$ e os íons $Mg^{2+}$ do sítio ativo da enolase. O nitrogênio está mostrado em azul, o fósforo em cor de laranja e os átomos de hidrogênio não são mostrados (PDB ID 1ONE).

dissulfeto estabilizadoras e uma fenda contendo o sítio ativo (**Figura 6-27a**). Mais de cinco décadas de investigações permitiram a obtenção de um quadro detalhado da estrutura e da atividade dessa enzima e também mostram uma história interessante de como a ciência da bioquímica progride.

O substrato da lisozima é um peptidoglicano, carboidrato encontrado na parede de muitas bactérias (ver Figura 20-30). A lisozima cliva a ligação C—O glicosídica ($\beta$1→4) (ver p. 252) entre dois tipos de resíduos de açúcares presentes na molécula, ácido *N*-acetilmurâmico (Mur2Ac) e *N*-acetilglicosamina (GlcNAc), geralmente referidos como NAM e NAG, respectivamente, na literatura da pesquisa em enzimologia (Figura 6-27b). Seis resíduos do peptidoglicano onde Mur2Ac e GlcNAc se alternam ligam-se no sítio ativo em sítios de ligação marcados de A a F. Foram feitos modelos que mostram que a cadeia lateral lactil do Mur2Ac não consegue se acomodar nos sítios C e E, restringindo a ligação de Mur2Ac apenas aos sítios B, D e F. Somente uma das ligações glicosídicas é clivada, a ligação entre o resíduo de Mur2Ac no sítio D e o resíduo de GlcNAc no sítio E. Os resíduos-chave de aminoácidos no sítio ativo são $Glu^{35}$ e $Asp^{52}$ (**Figura 6-28a**). A reação consiste em uma substituição nucleofílica com o —OH da água substituindo a GlcNAc no C-1 do Mur2Ac.

A identificação dos resíduos do sítio ativo e a disponibilidade do conhecimento da estrutura da enzima permitiram entender as etapas do mecanismo de reação na década de 1960. Entretanto, evidências definitivas de um mecanismo exato enganaram os investigadores por quase quatro décadas. Dois são os mecanismos quimicamente aceitáveis que podem gerar os produtos da clivagem de ligações glicosídicas mediadas pela lisozima. Phillips e seus colegas propuseram um mecanismo de dissociação do tipo $S_N1$ (Figura 6-28a, à esquerda), no qual a GlcNAc inicialmente se dissocia na etapa ①, deixando para trás como intermediário um cátion (um carbocátion) glicosil. Nesse mecanismo, o grupo de saída GlcNAc é protonado por catálise geral ácida pelo $Glu^{35}$ localizado no bolsão hidrofóbico que dá ao seu grupo carboxílico um $pK_a$ surpreendentemente alto. O carbocátion é estabilizado por ressonância envolvendo o oxigênio do anel adjacente, assim como interações eletrostáticas com a carga negativa do $Asp^{52}$ que está próximo. Na etapa ②, a água ataca o C-1 do Mur2Ac, liberando o produto. O mecanismo alternativo (Figura 6-28a, à direita) envolve duas etapas consecutivas de deslocamentos diretos do tipo $S_N2$. Na etapa ❶, o $Asp^{52}$ ataca o C-1 do Mur2Ac deslocando GlcNAc. Do mesmo modo que no primeiro mecanismo, o $Glu^{35}$ age como um ácido geral protonando o grupo de saída GlcNAc. Na etapa ❷, a água ataca o C-1 do Mur2Ac para deslocar o $Asp^{52}$, gerando o produto.

O mecanismo de Phillips ($S_N1$) foi amplamente aceito por mais de três décadas. Entretanto, certo grau de controvérsia persistiu e os testes continuaram. Algumas vezes o método científico avança lentamente, sendo difícil planejar experimentos que mostrem uma resposta definitiva. Alguns dos primeiros argumentos contra o mecanismo de Phillips eram sugestivos, mas não completamente persuasivos. Por exemplo, a meia-vida do cátion glicosil proposto era estimada em $10^{-12}$ segundos, apenas um pouco maior que a vibração molecular, o que não é demorado o bastante para as necessidades de difusão das outras moléculas. Mais importante ainda, a lisozima pertence à família de enzimas

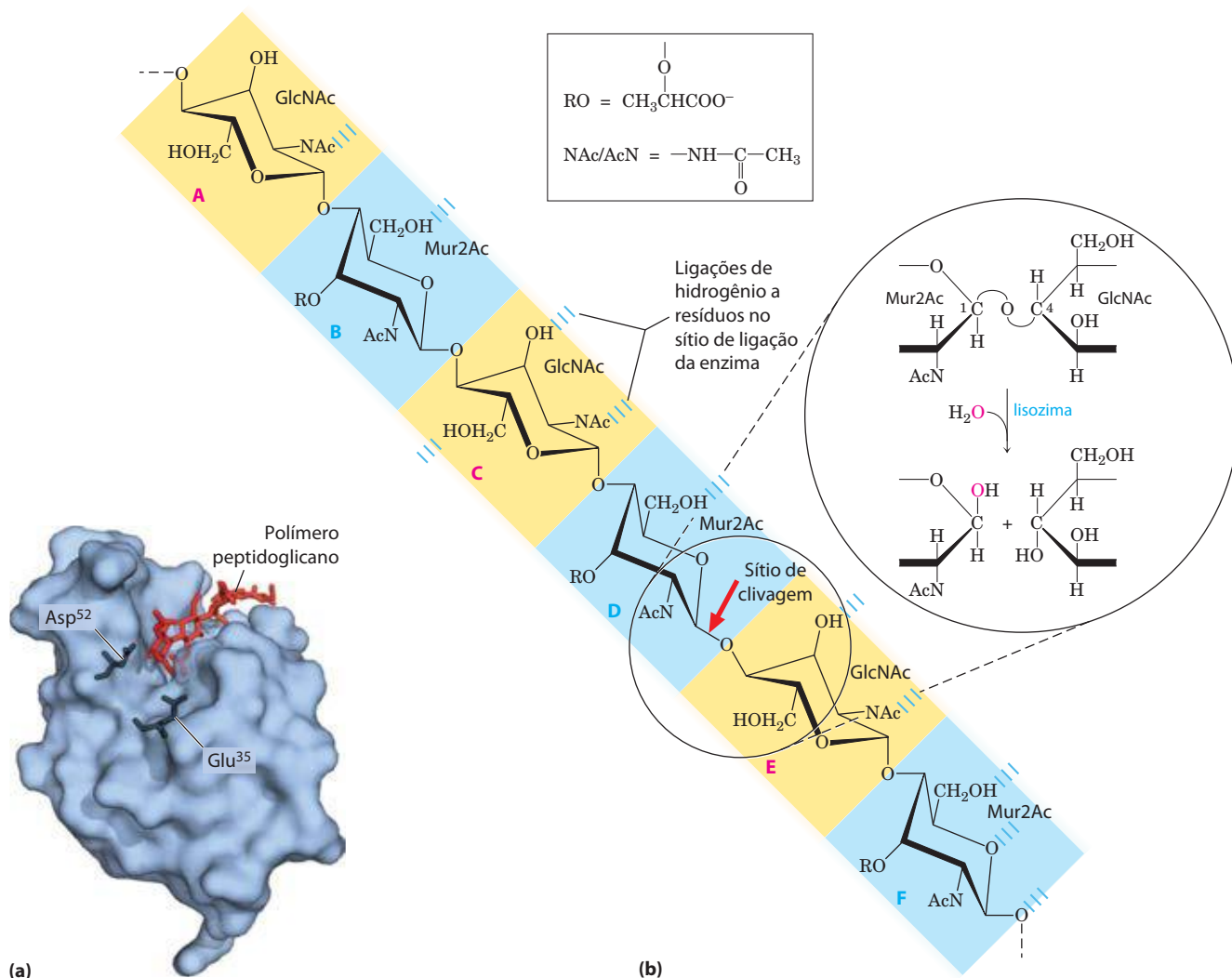
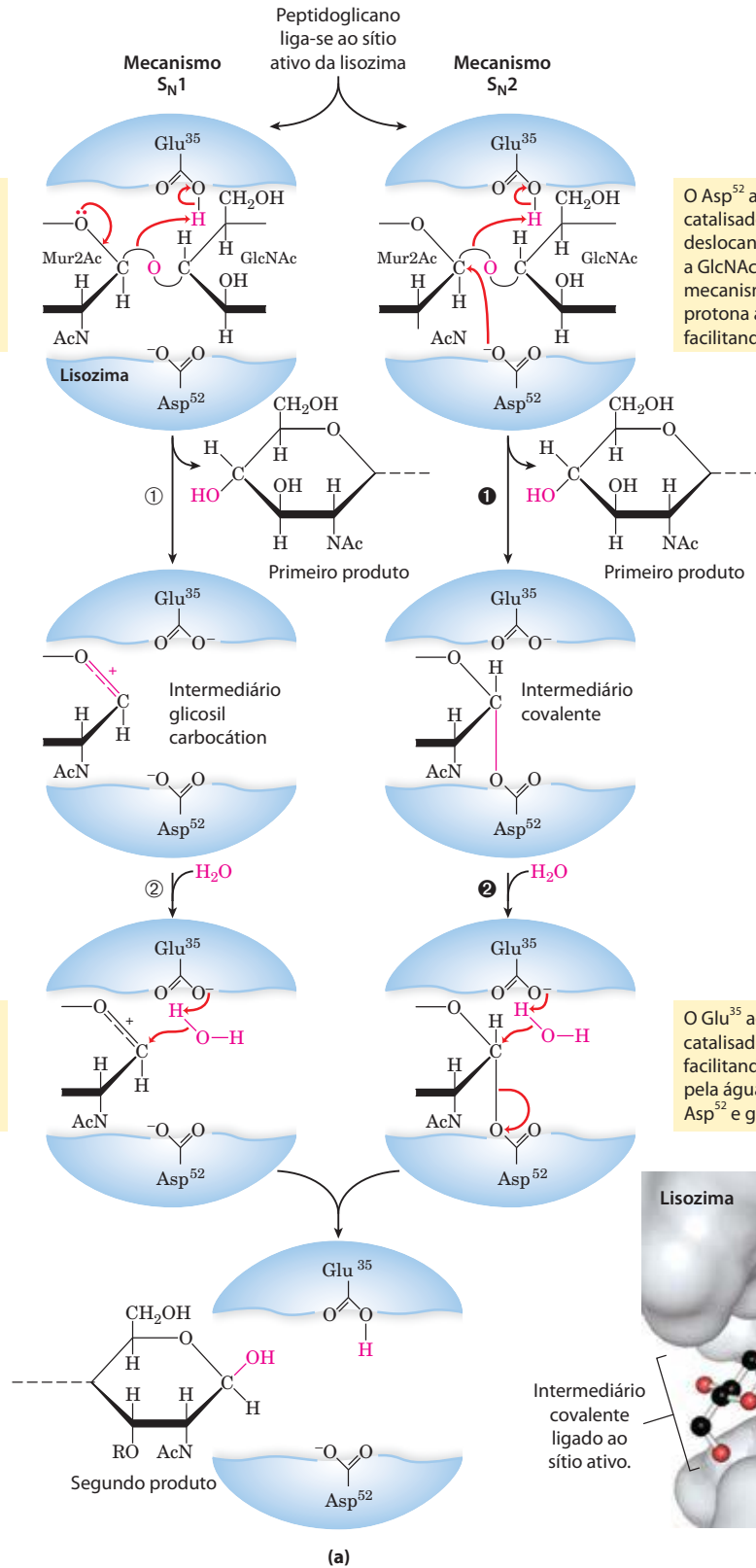



**FIGURA 6-27 Lisozima da clara de ovo e a reação que ela catalisa. (a)** Representação da superfície da enzima com os resíduos do sítio ativo Glu[35] e Asp[53] representados em preto na forma de bastão e o substrato ligado representado em vermelho na forma de bastão (PDB 1D 1LZE). **(b)** Reação catalisada pela lisozima da clara de ovo. Um segmento do polímero peptidoglicano é mostrado, com os sítios de ligação de A a F sombreados. A ligação hidrolisada é a ligação glicolítica C—O entre os resíduos de açúcar ligados aos sítios D e E, indicada pela seta vermelha. A reação de hidrólise está mostrada no detalhe, com o caminho do oxigênio crítico da água em vermelho. Mur2Ac é o ácido *N*-acetilmurâmico, GlcNAc, *N*-acetilglicosamina. RO— representa um grupo lactil (ácido láctico); —NAc e AcN—, grupos *N*--acetil (ver legenda).

conhecidas como "glicosidases de retenção". Além disso, todos os membros catalisam reações cujos produtos têm a mesma configuração anomérica dos substratos (a configuração anomérica dos carboidratos é examinada no Capítulo 7) e, sabe-se, têm intermediários covalentes reativos do tipo previsto na via alternativa ($S_N2$). Desse modo, o mecanismo de Phillips é antagônico aos achados experimentais de enzimas semelhantes.

Um experimento foi decisivo para pender a balança em favor do mecanismo via $S_N2$ (relatado por Stephen Withers e colegas em 2001). Usando uma enzima mutante (com o resíduo 35 alterado de Glu para Gln) e substratos artificiais, os quais combinados reduziram a velocidade das etapas-chave da reação, esses pesquisadores foram capazes de estabilizar o intermediário covalente fugaz. Por sua vez, isso lhes permitiu observar diretamente o intermediário por meio de espectrometria de massas e cristalografia por raios X (Figura 6-28b).

O mecanismo da lisozima estaria provado? Não. Uma característica-chave do método científico, como certa vez Albert Einstein resumiu, é que "mesmo uma infinidade de experimentos talvez não consiga provar que estou certo, mas um único experimento pode provar que estou errado". No caso do mecanismo da lisozima, pode-se argumentar (e muitos o fizeram) que os substratos artificiais com substituições por flúor em C-1 e C-2, que foram usados para estabilizar os intermediários covalentes, poderiam alterar o curso da reação. O flúor altamente eletronegativo poderia desestabilizar um íon oxocarbânion elétron-deficiente já formado no cátion glicosil intermediário que ocorre na via $S_N1$. Mesmo assim, a via $S_N2$ é reconhecida hoje como o mecanismo mais compatível com os dados disponíveis.

**MECANISMO-FIGURA 6-28 Reação da lisozima.** Nesta reação (descrita no texto), a água é introduzida no produto pelo C-1 do Mur2Ac na mesma configuração que a ligação glicosídica original. A reação é, portanto, uma substituição molecular com retenção da configuração. **(a)** Duas vias propostas que potencialmente explicam a reação total e suas propriedades. A via $S_N1$ (esquerda) é o mecanismo original de Phillips. A via $S_N2$ (direita) é o mecanismo mais consistente com os dados atuais. **(b)** Representação da superfície do sítio ativo da lisozima com o intermediário covalente enzima-substrato mostrado como estruturas em esfera e bastão. Cadeias laterais dos resíduos do sítio ativo são mostradas como estruturas em esfera e bastão protuberantes em relação às fitas (PDB ID 1H6M).

## O conhecimento de um mecanismo enzimático leva à produção de antibióticos úteis

A penicilina foi descoberta em 1928 por Alexander Fleming, mas foram necessários ainda 15 anos para que esse composto relativamente instável fosse conhecido o suficiente para poder ser utilizado como agente terapêutico no tratamento de infecções bacterianas. A penicilina interfere com a síntese do peptidoglicano (descrita no Capítulo 20, Figura 20-31), o constituinte principal da rígida parede celular que protege as bactérias da lise osmótica. O peptidoglicano é formado por polissacarídeos e peptídeos ligados por ligações cruzadas formadas em várias etapas, incluindo uma reação de transpeptidase (**Figura 6-29**). Essa é a reação inibida pela penicilina e por compostos semelhantes (**Figura 6-30a**), que mimetizam uma conformação do segmento D-Ala-D-Ala do precursor do peptidoglicano. A ligação peptídica do precursor é substituída por um anel $\beta$-lactâmico altamente reativo. Quando a penicilina liga-se à transpeptidase, a Ser do sítio ativo ataca o carbonil do anel $\beta$-lactâmico e gera um aduto covalente entre a penicilina e a enzima. Entretanto, o grupo de saída permanece unido, pois está ligado ao remanescente do anel $\beta$-lactâmico (Figura 6-30b). O complexo covalente inibe irreversivelmente a enzima. Isso, por sua vez, bloqueia a síntese da parede bacteriana e muitas bactérias morrem porque a frágil membrana interna rompe-se devido à pressão osmótica.

O uso da penicilina e de seus derivados pelo homem levou ao surgimento de linhagens de bactérias patogênicas que expressam **$\beta$-lactamases** (**Figura 6-31a**), enzimas que clivam os antibióticos $\beta$-lactâmicos, inativando-os. Desse modo, a bactéria torna-se resistente a esses antibióticos. Os genes dessas enzimas disseminaram-se rapidamente entre as populações de bactérias submetidas à pressão seletiva imposta pelo uso (muitas vezes, excessivo) dos antibióticos $\beta$-lactâmicos. A medicina respondeu com o desenvolvimento de compostos como o ácido clavulânico, um inativador suicida, que inativa irreversivelmente essas $\beta$-lactamases (Figura 6-31b). O ácido clavulânico mimetiza a estrutura dos antibióticos $\beta$-lactâmicos, formando um aduto covalente com a Ser do sítio ativo da $\beta$-lactamase. Isso leva a um rearranjo que cria um derivado muito mais reativo, que depois é atacado por outro nucleófilo no sítio ativo, de modo a acilar e inativar a enzima irreversivelmente. A amoxicilina e o ácido clavulânico são combinados na formulação farmacêutica amplamente usada e comercializada sob o nome de Calvulin. O ciclo da guerra química entre humanidade e bactérias continua sem tréguas. Foram encontradas linhagens de bactérias patogênicas resistentes tanto à amoxicilina quanto ao ácido clavulânico (refletindo mutações na $\beta$-lactamase que as tornam insensíveis ao ácido clavulânico). Prevê-se que o desenvolvimento de novos antibióticos venha a ser uma indústria em crescimento no futuro próximo. ■

**FIGURA 6-29 A reação da transpeptidase.** Esta reação, que liga dois peptidoglicanos precursores em um polímero maior, é facilitada por uma Ser no sítio ativo por meio de um mecanismo catalítico covalente similar ao da quimotripsina. Observe que esse peptidoglicano é um dos poucos casos na natureza em que aparecem D-aminoácidos. A Ser do sítio ativo ataca o carbonil da ligação peptídica entre dois resíduos de D-Ala, criando uma ligação éster (ligação covalente) entre o substrato e a enzima e liberando o resíduo terminal D-Ala. Um grupo amino do segundo precursor peptidoglicano então ataca a ligação éster, deslocando a enzima e ligando transversalmente os dois precursores entre si.

### RESUMO 6.4 Exemplos de reações enzimáticas

- A quimotripsina é uma serino-protease com mecanismo bem conhecido, caracterizado por catálise geral acidobásica, catálise covalente e estabilização do estado de transição.

Grupos R

Cadeia lateral

Anel tiazolínico

Anel $\beta$-lactâmico

Penicilina G (benzilpenicilina)

Penicilina V

Amoxicilina

Estrutura geral das penicilinas

**(a)**

Trans-peptidase

Penicilina

Transpeptidase alterada de forma estável, inativa

**(b)**

**FIGURA 6-30 Inibição da transpeptidase por antibióticos $\beta$-lactâmicos. (a)** Antibióticos $\beta$-lactâmicos apresentam um anel de cinco elementos tiazolidina fusionado a um anel $\beta$-lactâmico de quatro elementos. Esse último anel é tensionado e inclui uma porção amida com papel crucial na inativação da síntese do peptidoglicano. O grupo R varia nas diferentes penicilinas. A penicilina G foi a primeira a ser isolada e permanece até hoje uma das mais eficazes. Devido à degradação no ambiente ácido do estômago, ela deve ser administrada por via injetável. Quase tão eficaz, a penicilina V é estável em meio ácido, por isso pode ser administrada por via oral. A amoxicilina tem ampla faixa de ação e apresenta rápida absorção quando administrada por via oral, sendo por isso o antibiótico $\beta$-lactâmico mais amplamente prescrito. **(b)** Ataque da porção amida do anel $\beta$-lactâmico pela Ser do sítio ativo da transpeptidase a um produto acil-enzima covalente que é hidrolisado tão lentamente que a formação do aduto é quase irreversível e, consequentemente, a transpeptidase é inativada.

$\beta$-Lactamase

Penicilina

$H_2O$

Penicilina inativa

**(a)**

Ácido clavulânico

Nu:

$\beta$-Lactamase inativa

**(b)**

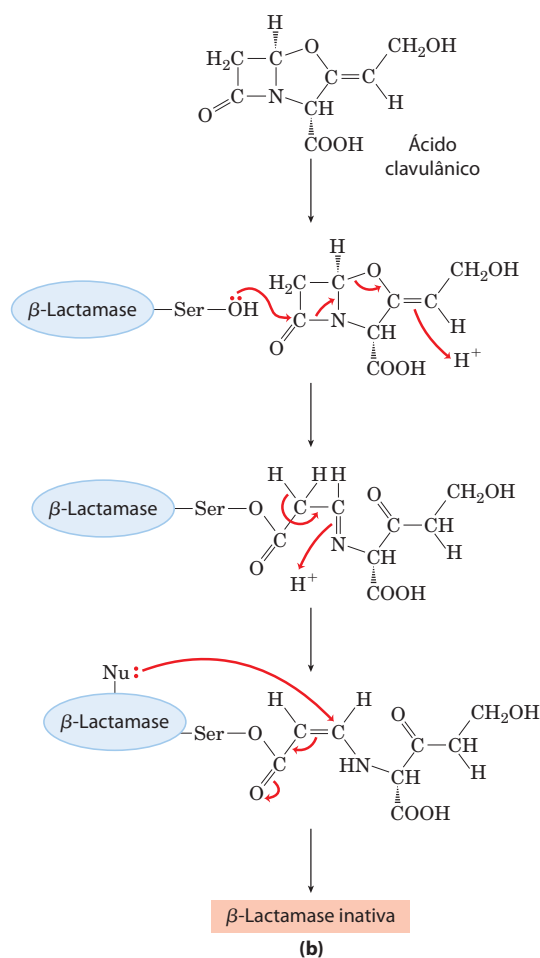
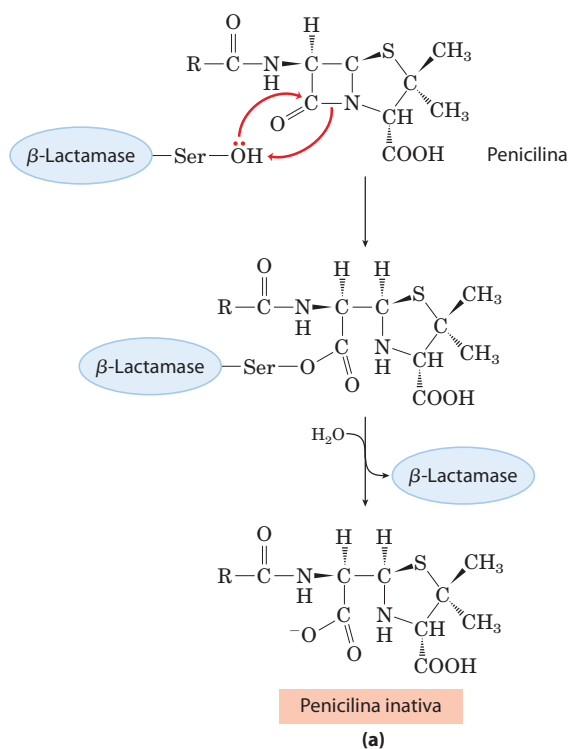



**FIGURA 6-31 $\beta$-Lactamases e inibição de $\beta$-lactamases. (a)** As $\beta$-lactamases promovem a clivagem do anel $\beta$-lactâmico dos antibióticos $\beta$-lactâmicos, inativando-os. **(b)** O ácido clavulânico é um inibidor suicida que usa o mecanismo químico normal das $\beta$-lactamases para formar uma espécie reativa no sítio ativo. Esta espécie reativa é atacada por um grupo nucleofílico (Nu:) no sítio ativo que acila irreversivelmente a enzima.

- A hexocinase é um exemplo excelente de ajuste induzido como meio de usar a energia de ligação do substrato.
- A reação da enolase ocorre via catálise por íon metálico.
- A lisozima utiliza catálise covalente e catálise geral acidobásica para promover duas reações sucessivas de deslocamento nucleofílico.
- O conhecimento do mecanismo de ação das enzimas permite desenvolver medicamentos que inibam a atividade de enzimas.

## 6.5 Enzimas regulatórias

No metabolismo celular, grupos de enzimas trabalham conjuntamente em vias sequenciais para realizar um determinado processo metabólico, como a degradação da glicose a lactato por uma série de reações ou as muitas reações da síntese de aminoácidos a partir de precursores simples. Nesses sistemas enzimáticos, o produto da reação de uma enzima é o substrato da enzima seguinte.

A maioria das enzimas das vias metabólicas segue os padrões cinéticos que foram descritos. Cada via, entretanto, inclui uma ou mais enzimas que influenciam em muito a velocidade de toda a sequência de reações. Essas **enzimas regulatórias** têm a atividade catalítica aumentada ou diminuída em resposta a certos sinais. Ajustes na velocidade das reações catalisadas por enzimas regulatórias e, portanto, ajustes na velocidade da sequência metabólica inteira permitem que as células atendam às necessidades de energia e das biomoléculas de que precisam para crescer e se manter.

As atividades das enzimas regulatórias são moduladas de várias maneiras. **Enzimas alostéricas** agem por meio de ligações reversíveis e não covalentes com compostos regulatórios denominados **moduladores alostéricos** ou **efetores alostéricos**, que geralmente são metabólitos pequenos ou cofatores. Outras enzimas são reguladas por **modificações covalentes** reversíveis. As duas classes de enzimas regulatórias tendem a ser proteínas com subunidades múltiplas e, em alguns casos, o(s) sítio(s) regulatório(s) e o sítio ativo se encontram em subunidades separadas. Os sistemas metabólicos têm ao menos dois outros mecanismos de regulação enzimática. Algumas enzimas são estimuladas ou inibidas quando estão ligadas a **proteínas regulatórias** distintas. Outras são ativadas quando segmentos peptídicos são removidos por **proteólise**. Diferentemente da regulação mediada por efetores, a regulação por proteólise é irreversível. Exemplos importantes desses mecanismos são encontrados em processos fisiológicos como digestão, coagulação do sangue, ação hormonal e visão.

O crescimento e a sobrevivência das células dependem do uso eficiente dos recursos disponíveis, e essa eficiência é possibilitada pelas enzimas regulatórias. Não há uma regra única para governar os diferentes tipos de regulação dos diferentes sistemas. Em certo grau, a regulação alostérica (não covalente) talvez possibilite os ajustes finos das vias metabólicas que constantemente são necessários e em níveis variando em decorrência das mudanças da atividade e das condições das células. A regulação por modificações covalentes pode ser do tipo “tudo ou nada”, normalmente no caso de proteólise, ou então possibilitar mudanças sutis na atividade. Vários tipos de regulação podem ocorrer em uma única enzima regulatória. O restante deste capítulo dedica-se à discussão desses métodos de regulação enzimática.

### Enzimas alostéricas sofrem mudanças conformacionais em resposta à ligação de moduladores

Como foi visto no Capítulo 5, proteínas alostéricas são aquelas que possuem “outras formas” ou conformações induzidas pela ligação de moduladores. O mesmo conceito se aplica a certas enzimas regulatórias, pois mudanças conformacionais induzidas por um ou mais moduladores interconvertem formas mais ativas e formas menos ativas da enzima. Moduladores de enzimas alostéricas podem ser inibitórios ou estimulatórios. Muitas vezes, o modulador é o próprio substrato. Enzimas regulatórias em que o substrato e o modulador são idênticos são denominadas homotrópicas. O efeito é similar ao da ligação de $O_2$ à hemoglobina (Capítulo 5). No caso das enzimas, a ligação do ligante, ou do substrato, provoca mudanças na conformação que afetam a atividade subsequente de outros sítios da proteína. Em muitos casos, as mudanças conformacionais convertem uma conformação relativamente inativa (geralmente denominada de estado T) em uma conformação mais ativa (estado R). Quando o modulador é uma molécula diferente do substrato, diz-se que a enzima é heterotrópica. Observe que os moduladores alostéricos não se confundem com os inibidores incompetitivos ou mistos. Embora os últimos se liguem a um segundo sítio da enzima, necessariamente não são mediadores de mudanças conformacionais entre formas ativas e inativas, de modo que os efeitos cinéticos são distintos.

As propriedades das enzimas alostéricas são significativamente diferentes das propriedades das enzimas não regulatórias. Parte das diferenças é estrutural. Além do sítio ativo, as enzimas alostéricas em geral têm um ou mais sítios regulatórios, ou alostéricos, para ligarem o modulador (**Figura 6-32**). Da mesma maneira que o sítio ativo das enzimas é específico para o seu substrato, cada sítio regulatório é específico para o seu modulador. Enzimas com vários moduladores em geral têm sítios de ligação específicos para cada um deles. Nas enzimas homotrópicas, o sítio ativo e o sítio regulatório são os mesmos.

As enzimas alostéricas geralmente são maiores que as enzimas não alostéricas, possuindo duas ou mais subunidades. Um exemplo clássico é a aspartato-transcarbamoilase (geralmente abreviada como ATCase), que catalisa uma reação inicial na biossíntese dos nucleotídeos de pirimidina, a reação entre carbamoil-fosfato e aspartato formando carbamoil-aspartato.

Carbamoil-fosfato + Aspartato ⇌ (Aspartato-transcarbamoilase; $P_i$) *N*-Carbamoilaspartato

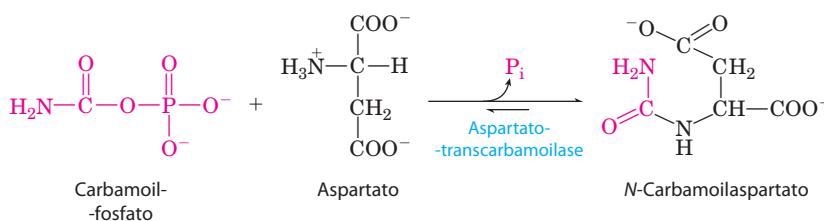
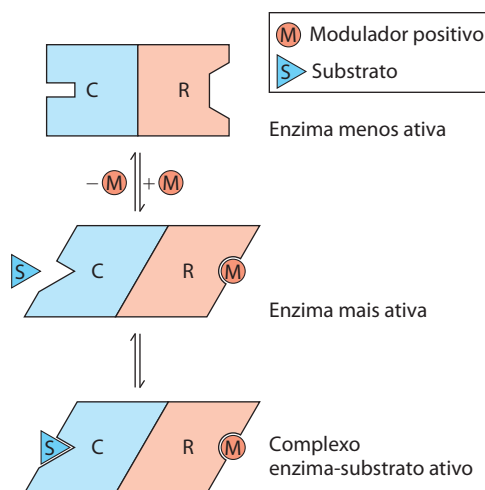



**FIGURA 6-32 Interações entre as subunidades de enzimas alostéricas e interações com inibidores e ativadores.** Em muitas enzimas alostéricas, o sítio de ligação ao substrato e o(s) sítio(s) de ligação(ões) com o modulador estão em subunidades diferentes, nas subunidades catalítica (C) e regulatória (R), respectivamente. A ligação de um modulador (M) positivo (estimulatório) ao sítio específico na subunidade regulatória é comunicada à subunidade catalítica por meio de uma mudança conformacional. Essa mudança afeta a o sítio ativo que então é capaz de ligar o substrato (S) com afinidade maior. Quando o modulador dissocia-se da subunidade regulatória, a enzima volta a sua forma inativa ou menos ativa.

A ATCase tem 12 cadeias polipeptídicas organizadas em 6 subunidades catalíticas (organizadas como 2 complexos triméricos) e 6 subunidades regulatórias (organizadas como 3 complexos diméricos). A **Figura 6-33** mostra a estrutura quaternária dessa enzima, deduzida da análise por raios X. A enzima exibe comportamento alostérico, detalhado a seguir, à medida que as subunidades catalíticas funcionam cooperativamente. As subunidades regulatórias têm sítios de ligação para ATP e CTP, que funcionam como reguladores positivo e negativo, respectivamente. CTP é um dos produtos finais da via e a regulação negativa por CTP serve para limitar a ação da ATCase em condições nas quais CTP é abundante. Por outro lado, altas concentrações de ATP indicam que o metabolismo celular está robusto, a célula está crescendo e uma quantidade adicional de nucleotídeos da pirimidina é necessária para apoiar a transcrição do RNA e replicação do DNA.

## As propriedades cinéticas das enzimas alostéricas desviam-se do comportamento de Michaelis-Menten

As enzimas alostéricas apresentam relações entre $V_0$ e [S] diferentes daquelas da cinética de Michaelis-Menten. Elas apresentam saturação pelo substrato quando [S] é suficientemente alta, mas algumas das enzimas alostéricas apresentam um gráfico de $V_0$ *versus* [S] (**Figura 6-34**) que produz uma curva de saturação sigmoide em vez da curva de saturação hiperbólica típica das enzimas não regulatórias. Na curva de saturação sigmoide verifica-se um valor de [S] no qual $V_0$ é metade da $V_{máx}$, mas que não é designado como $K_m$, pois a enzima não segue uma relação de Michaelis-Menten hiperbólica. Os símbolos $[S]_{0,5}$ e $K_{0,5}$ geralmente são usados para representar a concentração de substrato que dá uma velocidade que é metade da máxima das enzimas alostéricas (Figura 6-34).

O comportamento da cinética sigmoide em geral reflete interações cooperativas entre as subunidades proteicas. Em outras palavras, mudanças na estrutura de uma subunidade são convertidas em mudanças estruturais nas subunidades adjacentes, efeito mediado por interações não covalentes na interface das subunidades. Os princípios que regem esse fenômeno são bem ilustrados em uma proteína que não é enzima: a ligação do $O_2$ à hemoglobina. O comportamento de cinética sigmoide é explicado por modelos de interações sequenciais concatenadas entre as subunidades (ver Figura 5-15).

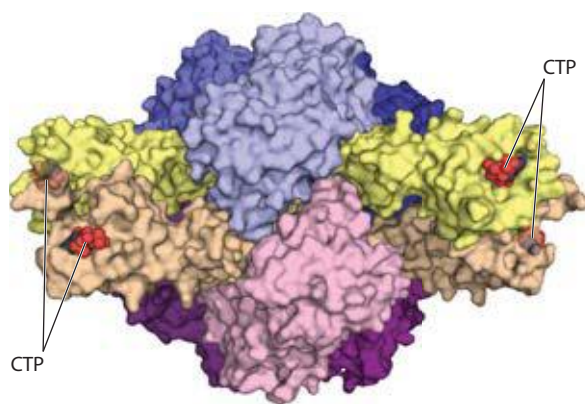
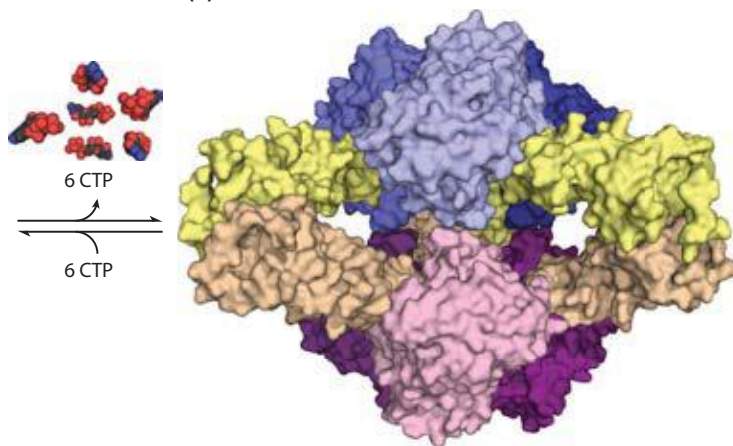



**FIGURA 6-33 A enzima regulatória aspartato-transcarbamoilase.** Estão mostrados os estados **(a)** inativo T (PDB ID 1RAB) e **(b)** ativo R (PDB ID 1F1B) da enzima. Esta enzima de regulação alostérica tem dois agrupamentos catalíticos volumosos, cada um com três cadeias polipeptídicas (sombreadas em azul e roxo) e três agrupamentos regulatórios, cada um com duas cadeias regulatórias (bege e amarelo). Os agrupamentos regulatórios formam os pontos de um triângulo (não evidente nesta imagem) rodeado pelas subunidades catalíticas. Os sítios de ligação para os moduladores alostéricos (incluindo CTP) estão nas subunidades regulatórias. A ligação com o modulador provoca grandes mudanças na conformação e na atividade da enzima. O papel desta enzima na síntese de nucleotídeos e também detalhes da sua regulação são discutidos no Capítulo 22.

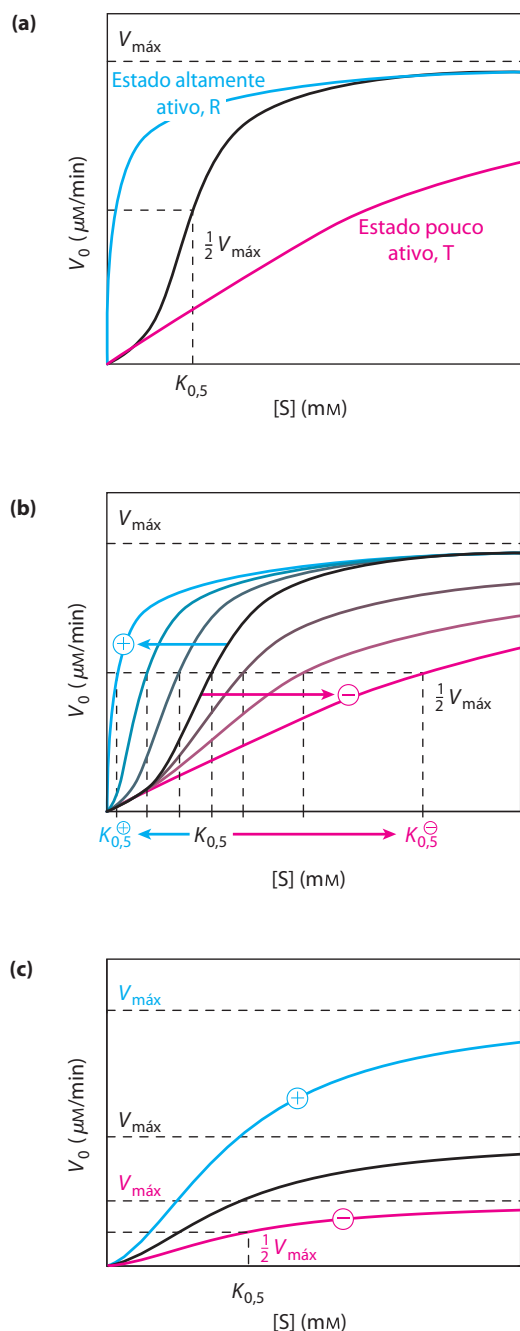



**FIGURA 6-34 Curvas de substrato-atividade de enzimas alostéricas representativas.** Três exemplos das respostas complexas das enzimas alostéricas aos seus moduladores. **(a)** Curva sigmoide de uma enzima homotrópica na qual o substrato atua também como modulador positivo (estimulatório), ou ativador. Observe a semelhança com a curva de saturação com oxigênio da hemoglobina (ver Figura 5-12). A curva sigmoide é uma curva híbrida na qual a enzima está presente primordialmente no estado relativamente inativo T em baixa concentração de substrato e principalmente no estado mais ativo R em alta concentração de substrato. As curvas dos estados puros T e R estão colocadas separadamente e coloridas. **(b)** Efeitos de diferentes concentrações de um modulador positivo (+) e de um modulador negativo (–) sobre uma enzima alostérica na qual há alteração de $K_{0,5}$ sem haver alteração de $V_{máx}$. A curva central mostra a relação substrato-atividade na ausência de modulador. No caso da ATCase, CTP é um modulador negativo e ATP modulador positivo. (c) Tipo menos comum de modulação, na qual $V_{máx}$ é alterada e $K_{0,5}$ permanece praticamente constante.

A ATCase ilustra perfeitamente bem tanto o comportamento da cinética homotrópica quanto da cinética heterotrópica. A ligação dos substratos, aspartato e carbamoil fosfato, à enzima leva gradualmente à transição do estado T relativamente inativo ao estado mais ativo R. Isso é responsável pela mudança sigmoidal e não hiperbólica em $V_0$ com o aumento de [S]. Uma característica da cinética sigmoide é a de que pequenas mudanças na concentração do modulador podem levar a grandes mudanças na atividade. A Figura 6-34a mostra como um aumento relativamente pequeno em [S] na fase de aclive da curva provoca um aumento comparativamente grande em $V_0$.

A regulação heterotrópica da ATCase é devido à interação com ATP e CTP. No caso de enzimas alostéricas heterotrópicas, um ativador pode fazer a curva se tornar mais próxima de uma hipérbole com diminuição no $K_{0,5}$, mas sem mudança na $V_{máx}$, resultando em aumento na velocidade de reação em uma concentração de substrato fixa. No caso da ATCase, a interação com ATP provoca isso e a enzima mostra uma curva $V_0$ *versus* [S] característica do estado ativo R, em concentrações suficientemente altas de ATP ($V_0$ é maior para qualquer valor de [S]; Figura 6-34b). Um modulador negativo (inibidor) produz uma curva de saturação pelo substrato *muito* mais sigmoidal, com um aumento de $K_{0,5}$, como é ilustrado pelos efeitos do CTP sobre a cinética da ATCase (ver curvas do modulador negativo Figura 6-34b). Outras enzimas alostéricas heterotrópicas respondem a um ativador aumentando a $V_{máx}$ com pequena mudança em $K_{0,5}$ (Figura 6-34c). Portanto, enzimas alostéricas heterotrópicas mostram diferentes tipos de respostas nas curvas atividade-substrato, pois algumas têm moduladores inibidores, enquanto outras têm moduladores ativadores, e ainda outras (como a ATCase) têm os dois tipos de moduladores.

## Algumas enzimas são reguladas por modificações covalentes reversíveis

Em outra classe de enzimas regulatórias, a atividade é modulada por modificações covalentes em um ou mais dos resíduos de aminoácidos da molécula da enzima. Mais de 500 tipos diferentes de modificações covalentes foram encontrados nas proteínas. Geralmente, os grupos modificadores incluem fosforil, acetil, adenilil, uridilil, metil, amida, carboxil, miristoíl, palmitoíl, prenil, hidroxila, sulfato e ribosiladenosina-difosfato (**Figura 6-35**). Existem até proteínas inteiras que são usadas como grupo modificador especial, incluindo a ubiquitina e a sumo. Esses diversos grupos geralmente são ligados e removidos às enzimas regulatórias por enzimas distintas. A modificação de um resíduo de aminoácido de uma enzima faz, efetivamente, um novo resíduo de aminoácido com propriedades diferentes ser introduzido na enzima. A introdução de uma carga pode alterar as propriedades locais da enzima e introduzir uma mudança na conformação. A introdução de um grupo hidrofóbico pode desencadear uma associação com uma membrana. Normalmente essas mudanças são substanciais e podem ser críticas para a função da enzima assim alterada.

A variedade de modificações nas enzimas é muito grande para ser abordada em detalhes, mas alguns exemplos po-

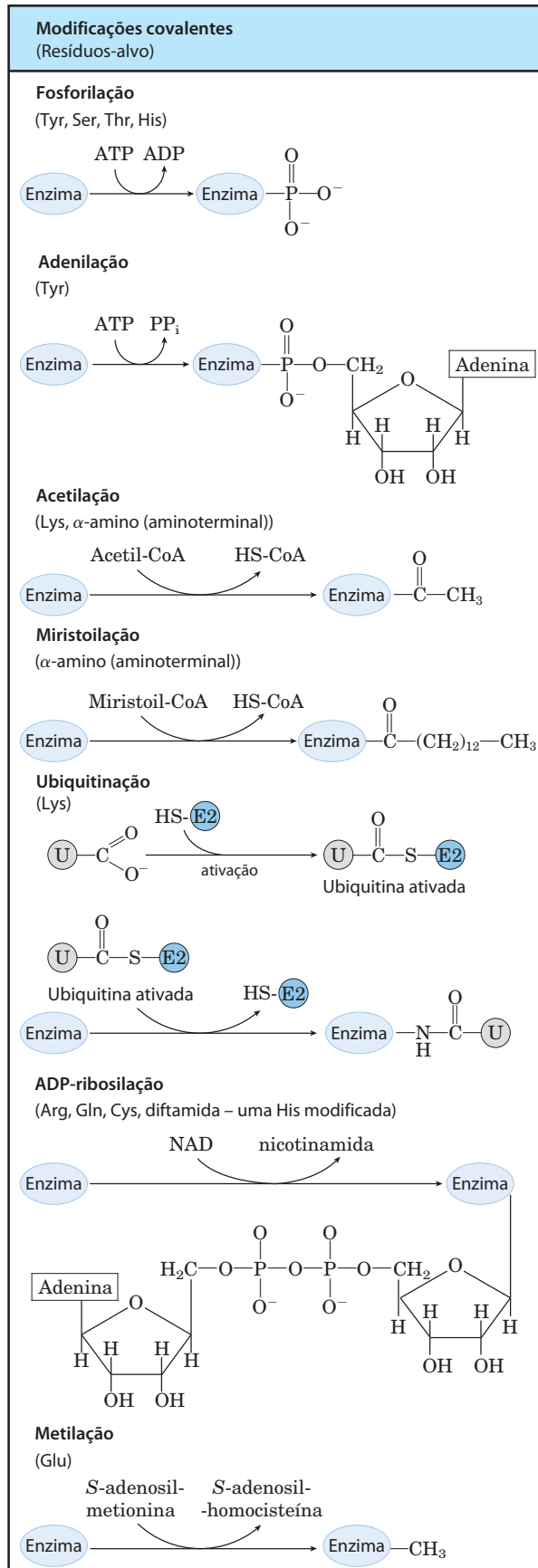



**FIGURA 6-35** **Algumas reações de modificações em enzimas.**

dem ser citados. Um exemplo de enzima regulada por metilação é a proteína aceptora de metilas da quimiotaxia de bactérias. Essa proteína é parte de um sistema que permite às bactérias nadarem na direção de um atraente (como um açúcar) ou se afastarem de um repelente químico. O agente metilante é a *S*-adenosilmetionina (adoMet) (ver Figura 18-18). A acetilação é uma modificação comum em aproximadamente 80% das enzimas solúveis dos procariotos, incluindo acetilação no aminoterminal. A ubiquitina é adicionada a proteínas como uma etiqueta que as marca para a degradação proteolítica (ver Figura 27-47). A ubiquitinação também pode ter uma função regulatória. A proteína sumo é encontrada ligada a muitas proteínas nucleares de eucariotos com papéis na regulação da transcrição, na estrutura da cromatina e no reparo do DNA.

A ADP-ribosilação é uma reação muito interessante que ocorre em certas proteínas. A ADP-ribose é derivada da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD) (ver Figura 8-38). Esse tipo de modificação ocorre na enzima bacteriana dinitrogenase-redutase e resulta na regulação da fixação biológica de nitrogênio, um processo muito importante. A toxina diftérica e a toxina do cólera são enzimas que catalisam a ADP-ribosilação (e a inativação) de enzimas ou proteínas celulares importantes.

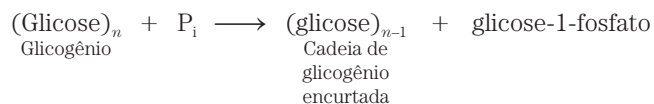
A fosforilação é, provavelmente, o tipo de modificação regulatória mais importante. Estima-se que um terço de todas as proteínas de uma célula eucariótica seja fosforilado de modo que um ou, mais frequentemente, vários eventos de fosforilação são parte de quase todos os processos regulatórios. Algumas proteínas têm apenas um resíduo fosforilado, outras têm vários e poucas têm dezenas de sítios de fosforilação. Esse modo de modificação covalente é fundamental em várias rotas regulatórias e, portanto, será discutido aqui em detalhes e também no Capítulo 12.

Todos esses tipos de modificações serão encontrados novamente em capítulos posteriores.

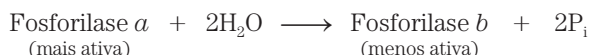
## Os grupos fosforil afetam a estrutura e a atividade catalítica das enzimas

A ligação de grupos fosforil a resíduos de aminoácidos específicos de proteínas é catalisada por **proteínas-cinases**. Nessas reações, o grupo γ-fosforil provindo de um nucleotídeo trifosfato (geralmente ATP) é transferido para um determinado resíduo de Ser, Thr ou Tyr (ocasionalmente também His) da proteína-alvo. Isso introduz um grupo carregado volumoso em uma região da proteína que é apenas moderadamente polar. Os átomos de oxigênio do grupo fosforil podem formar ligações de hidrogênio com um ou mais grupos da proteína, normalmente grupos amida do esqueleto peptídico no começo de hélices α ou com o grupo guanidino carregado dos resíduos de Arg. As duas cargas negativas de uma cadeia lateral fosforilada também podem repelir resíduos carregados negativamente (Asp ou Glu) das redondezas. Quando a modificação da cadeia lateral se localiza em uma região da enzima que seja crítica para estrutura tridimensional da enzima a fosforilação pode ter efeitos drásticos sobre a conformação e, portanto, sobre a ligação com o substrato e a catálise. A remoção dos grupos fosforil dessas proteínas é catalisada por **proteína-fosfatases**.

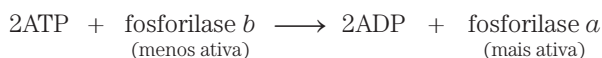
Um exemplo importante de enzima regulada por fosforilação é constituído pela glicogênio-fosforilase ($M_r$ 94.500) do músculo e do fígado (Capítulo 15), que catalisa a reação

$$\underset{\text{Glicogênio}}{(\text{Glicose})_n} + P_i \longrightarrow \underset{\substack{\text{Cadeia de}\\\text{glicogênio}\\\text{encurtada}}}{(\text{glicose})_{n-1}} + \text{glicose-1-fosfato}$$

A glicose-1-fosfato assim formada pode ser usada para a síntese de ATP no músculo ou ser convertida em glicose livre no fígado. Observe que a glicogênio-fosforilase, embora adicione um fosfato a um substrato, ela mesma não é uma cinase porque não utiliza ATP ou qualquer outro nucleotídeo trifosfato como doador de fosfato na reação que catalisa. Entretanto, ela é o substrato de uma proteína-cinase que a fosforila. Os grupos fosforil envolvidos na discussão abaixo são aqueles envolvidos na regulação da enzima e não na função catalítica.

A glicogênio-fosforilase ocorre em duas formas: a fosforilase *a* (mais ativa) e a fosforilase *b* (menos ativa) (**Figura 6-36**). A fosforilase *a* tem duas subunidades, cada uma com um resíduo específico de Ser que é fosforilado no grupo hidroxila. Esses resíduos de serina-fosfato são necessários para a atividade máxima da enzima. Os grupos fosforil podem ser removidos hidroliticamente por uma enzima distinta denominada fosforilase-fosfatase.

$$\underset{\text{(mais ativa)}}{\text{Fosforilase } a} + 2H_2O \longrightarrow \underset{\text{(menos ativa)}}{\text{Fosforilase } b} + 2P_i$$

Nessa reação, a fosforilase *a* é convertida em fosforilase *b* pela remoção de dois fosfatos covalentemente ligados a serinas, uma em cada subunidade da glicogênio-fosforilase.

Por sua vez, a fosforilase *b* pode ser reativada, sendo mais uma vez transformada covalentemente na fosforilase *a* ativa, por uma outra enzima, a fosforilase-cinase, que catalisa a transferência de grupos fosforil do ATP para grupos hidroxila de dois resíduos de Ser específicos na fosforilase *b*:

$$2\text{ATP} + \underset{\text{(menos ativa)}}{\text{fosforilase } b} \longrightarrow 2\text{ADP} + \underset{\text{(mais ativa)}}{\text{fosforilase } a}$$

A degradação do glicogênio no músculo esquelético e no fígado é regulada por variações na proporção entre as duas formas de glicogênio-fosforilase. As formas *a* e *b* diferem quanto às suas estruturas secundárias, terciárias e quaternárias e, consequentemente, a atividade catalítica muda à medida que as duas formas se interconvertem.

A regulação da glicogênio-fosforilase por fosforilação ilustra o efeito da adição de um grupo fosforil tanto na estrutura quanto na atividade catalítica. No estado desfosforilado, cada subunidade dessa enzima é dobrada de modo a colocar os 20 resíduos da extremidade aminoterminal, incluindo certo número de resíduos básicos, em uma região contendo vários aminoácidos ácidos. Isso produz uma interação eletrostática que estabiliza a conformação. A fosforilação da $Ser^{14}$ interfere com essa interação, forçando o domínio aminoterminal para fora do ambiente ácido e para uma conformação que permite interações entre Ⓟ-Ser e várias cadeias laterais de Arg, sendo que a enzima é muito mais ativa nessa conformação.

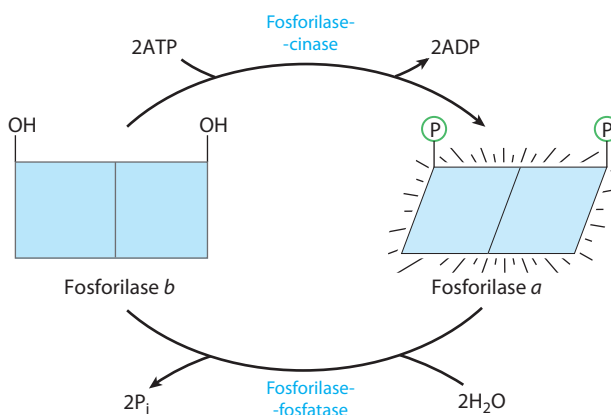



**FIGURA 6-36 Regulação da atividade da glicogênio-fosforilase muscular por fosforilação.** Na forma mais ativa da enzima (fosforilase *a*), resíduos específicos de Ser, um em cada subunidade, estão fosforilados. A fosforilase *a* é convertida na fosforilase *b* (forma menos ativa) pela perda enzimática desses grupos fosforil, efetuada pela fosfoproteína-fosfatase 1 (PP1). A fosforilase *b* pode ser reconvertida (reativada) em fosforilase *a* pela ação da fosforilase-cinase.

A fosforilação de uma enzima pode afetar a catálise de outra maneira: alterando a afinidade pelo substrato. Por exemplo, quando a isocitrato-desidrogenase (enzima do ciclo do ácido cítrico; Capítulo 16) é fosforilada, a repulsão eletrostática pelo grupo fosforil inibe a ligação do citrato (ácido tricarboxílico) no sítio ativo.

## Fosforilações múltiplas possibilitam um controle requintado da regulação

Os resíduos de Ser, Thr ou Tyr – geralmente fosforilados nas proteínas reguladas – ocorrem em motivos estruturais comuns, chamados de sequências de consenso, reconhecidos por proteínas-cinases específicas (Tabela 6-10). Algumas cinases são basófilas, preferindo fosforilar resíduos que têm vizinhança básica, e outras têm preferências diferentes pelos substratos, como um resíduo próximo a um resíduo de Pro. Entretanto, a sequência de aminoácidos não é o único fator importante que influencia o quanto determinado resíduo será fosforilado. O enovelamento da proteína aproxima resíduos distantes na sequência primária, e a estrutura tridimensional resultante pode estabelecer o quanto uma proteína-cinase terá acesso a determinado resíduo e reconhecê-lo como substrato. Outro fator que influencia a especificidade de certas proteínas-cinases pelo substrato é a proximidade com outros resíduos fosforilados.

Geralmente a regulação por fosforilação é complexa. Algumas proteínas possuem sequências de consenso reconhecidas por proteínas-cinases diferentes, cada uma delas fosforilando a proteína e alterando a atividade enzimática. Em alguns casos, a fosforilação é hierárquica: certos resíduos podem ser fosforilados apenas se um resíduo vizinho já estiver fosforilado. Por exemplo, a glicogênio-sintase, a enzima que catalisa a condensação de monômeros de glicose para formar glicogênio (Capítulo 15), é inativada por fosforilação de resíduos de Ser específicos e também é mo-

**TABELA 6-10** Sequências de consenso das proteínas-cinases

| Proteína-cinase | Sequência de consenso e resíduos fosforilados |
|---|---|
| Proteína-cinase A | -x-R-[RK]-x-[ST]-B |
| Proteína-cinase G | -x-R-[RK]-x-[ST]-x- |
| Proteína-cinase C | -[RK](2)-x-[ST]-B-[RK](2)- |
| Proteína-cinase B | -x-R-x-[ST]-x-K |
| $Ca^{2+}$/calmodulina-cinase I | -B-x-R-x(2)-[ST]-x(3)-B |
| $Ca^{2+}$/calmodulina-cinase II | -B-x-[RK]-x(2)-[ST]-x(2)- |
| Cinase da cadeia leve da miosina (músculo liso) | -K(2)-R-x(2)-S-x-B(2)- |
| Fosforilase-*b*-cinase | *-K-R-K-Q-I-S-V-R* |
| Cinase regulada por sinal extracelular (ERK) | -P-x-[ST]-P(2)- |
| Proteína-cinase dependente de ciclina (cdc2) | -x-[ST]-P-x-[KR]- |
| Caseína-cinase I | -[SpTp]-x(2)-[ST]-B* |
| Caseína-cinase II | -x-[ST]-x(2)-[ED]-x- |
| Cinase do receptor $\beta$-adrenérgico | -[DE](*n*)-[ST]-x(3) |
| Rodopsina-cinase | -x(2)-[ST]-E(*n*)- |
| Cinase do receptor de insulina | -x-E(3)-Y-M(4)-*K(2)-S-R-G-D-Y-M-T-M-Q-I-G-K(3)-L-P-A-T-G-D*-Y-M-N-M-S-P-V-G-D |
| Cinase do receptor do fator de crescimento do epitélio (EGF) | *-E(4)-Y-F-E-L-V* |

**Fontes:** Pinna, L.A. & Ruzzene, M.H. (1996) How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta* **1314**, 191–225; Kemp, B.E. & Pearson, R.B. (1990) Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 342–346; Kennelly, P.J. & Krebs, E.G. (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **266**, 15,555–15,558.

**Nota:** Estão mostradas as sequências de consenso deduzidas (em caracteres normais) e as sequências verdadeiras obtidas de substratos já conhecidos (em itálico). Os resíduos de Ser (S), Thr (T) ou Tyr (Y) que sofrem fosforilação estão em vermelho. Todos os resíduos de aminoácidos estão mostrados segundo o código de abreviação de uma letra (ver Tabela 3-1). × representa qualquer aminoácido; B qualquer aminoácido hidrofóbico; Sp, Tp e Yp são resíduos de Ser, Thr e Tyr que já devem estar fosforilados para que a cinase reconheça o sítio.

*O melhor sítio-alvo tem dois resíduos de aminoácidos separando os resíduos-alvo fosforilados de Ser/Thr; sítios-alvo separados por um ou três resíduos funcionam em nível reduzido.

dulada por ao menos quatro outras proteínas-cinases que fosforilam quatro outros sítios na enzima (**Figura 6-37**). A enzima não é substrato para a glicogênio-sintase-cinase 3, por exemplo, a menos que um sítio tiver sido fosforilado pela caseína-cinase II. Algumas fosforilações inibem a glicogênio-sintase mais que outras, e algumas combinações de fosforilações são cumulativas. Essas múltiplas fosforilações regulatórias fornecem o potencial para a modulação extremamente sutil da atividade enzimática.

Para servir como mecanismo regulatório efetivo, a fosforilação deve ser reversível. Em geral, grupos fosforil são adicionados e removidos por enzimas diferentes e, desse modo, o processo pode ser regulado separadamente. As células contêm uma família de fosfoproteína-fosfatases que hidrolisam ésteres de Ⓟ-Ser, Ⓟ-Thr e Ⓟ-Tyr, liberando $P_i$. As fosfoproteína-fosfatases vistas até agora agem apenas sobre um grupo de fosfoproteínas e apresentam menor especificidade pelo substrato que as proteínas-cinases.

## Algumas enzimas e outras proteínas são reguladas pela proteólise de precursores de enzimas

No caso de algumas enzimas, um precursor inativo denominado **zimogênio** é hidrolisado formando a enzima ativa. Muitas das enzimas proteolíticas (proteases) do estômago e do pâncreas são reguladas dessa maneira. A quimotripsina e a tripsina são inicialmente sintetizadas como quimotripsinogênio e tripsinogênio (**Figura 6-38**). Clivagens específicas provocam mudanças conformacionais que expõem o sítio ativo da enzima. Como esse tipo de ativação é irreversível, são necessários outros mecanismos para inativar essas enzimas. As proteases são inibidas por proteínas inibidoras que se ligam firmemente aos seus sítios ativos. Por exemplo, o inibidor da tripsina pancreática ($M_r$ 6.000) liga-se à tripsina e a inibe. A $\alpha_1$-antiproteinase ($M_r$ 53.000) inibe principalmente a elastase de neutrófilos (neutrófilos são um tipo de leucócitos, ou glóbulos brancos do sangue; a elastase é uma protease que age sobre a elastina, um componente de alguns tecidos conectivos). A insuficiência de $\alpha_1$-antiproteinase, que pode ser uma das consequências do hábito de fumar, tem sido associada com dano pulmonar, incluindo o enfisema.

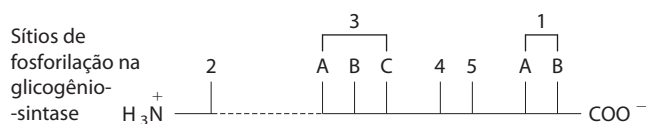
As proteases não são as únicas proteínas ativadas por proteólise. Em outros casos, entretanto, os precursores não são chamados de zimogênios, mas, de maneira mais geral, são denominados **pró-proteínas** ou **pró-enzimas**, conforme for o caso. Por exemplo, o colágeno (proteína do tecido conectivo) é inicialmente sintetizado como precursor so-

| Cinase | Sítios de fosforilação | Grau de inativação da síntese |
|---|---|---|
| Proteína-cinase A | 1A, 1B, 2, 4 | + |
| Proteína-cinase G | 1A, 1B, 2 | + |
| Proteína-cinase C | 1A | + |
| $Ca^{2+}$/calmodulina-cinase | 1B, 2 | + |
| Fosforilase *b* cinase | 2 | + |
| Caseína-cinase I | Pelo menos nove | + + + + |
| Caseína-cinase II | 5 | 0 |
| Glicogênio-sintase--cinase 3 | 3A, 3B, 3C | + + + |
| Glicogênio-sintase--cinase 4 | 2 | + |

**FIGURA 6-37 Múltiplas fosforilações regulatórias.** A enzima glicogênio-sintase tem pelo menos nove sítios separados, localizados em cinco regiões, suscetíveis à fosforilação por uma das proteínas-cinases celulares. Portanto, a regulação dessa enzima não é binária (liga/desliga), mas é modulada finamente com uma grande amplitude em resposta a uma gama de sinais.

lúvel, o pró-colágeno. A coagulação do sangue é mediada por uma cascata complicada de ativações proteolíticas. A fibrina, a proteína do coágulo sanguíneo, é produzida por proteólise do fibrinogênio, a pró-proteína inativa. A protease responsável por essa ativação é a trombina (em muitos aspectos, semelhante à quimotripsina), a qual, por sua vez, é produzida por proteólise de uma pró-proteína (nesse caso um zimogênio), a protrombina.

## Uma cascata de zimogênios ativados proteoliticamente leva à coagulação do sangue

O coágulo sanguíneo é um agregado de fragmentos celulares denominados plaquetas em ligações cruzadas e estabilizado por fibras proteináceas formadas principalmente por fibrina (**Figura 6-39a**). A fibrina é derivada de um zimogênio denominado de fibrinogênio. Depois das albuminas e globulinas, o fibrinogênio geralmente é o terceiro tipo de proteína mais abundante no plasma sanguíneo. A formação do coágulo sanguíneo é um exemplo bem estudado de **cascata regulatória**, mecanismo que proporciona respostas muito sensíveis a – e amplificação de – um sinal molecular. Essas vias também têm vários outros tipos de regulação.

Nas cascatas regulatórias, um sinal leva à ativação de uma proteína X. A proteína X catalisa a ativação da proteína Y. A proteína Y catalisa a ativação da proteína Z e assim por diante. Uma vez que as proteínas X, Y e Z são catalisadores e ativam muitas cópias da proteína seguinte na cascata, o sinal é amplificado em cada etapa. Em alguns casos, a etapa de ativação envolve a clivagem proteolítica e, portanto, a etapa é efetivamente irreversível. Em outros casos, a ativação é por uma etapa de modificação como fosforilação, facilmente reversível. As cascatas regulatórias governam uma grande variedade de processos biológicos, incluindo a determinação do destino das células durante o desenvolvimento, a detecção da luz pelos bastonetes da retina, a morte celular programada (apoptose) e a coagulação sanguínea.

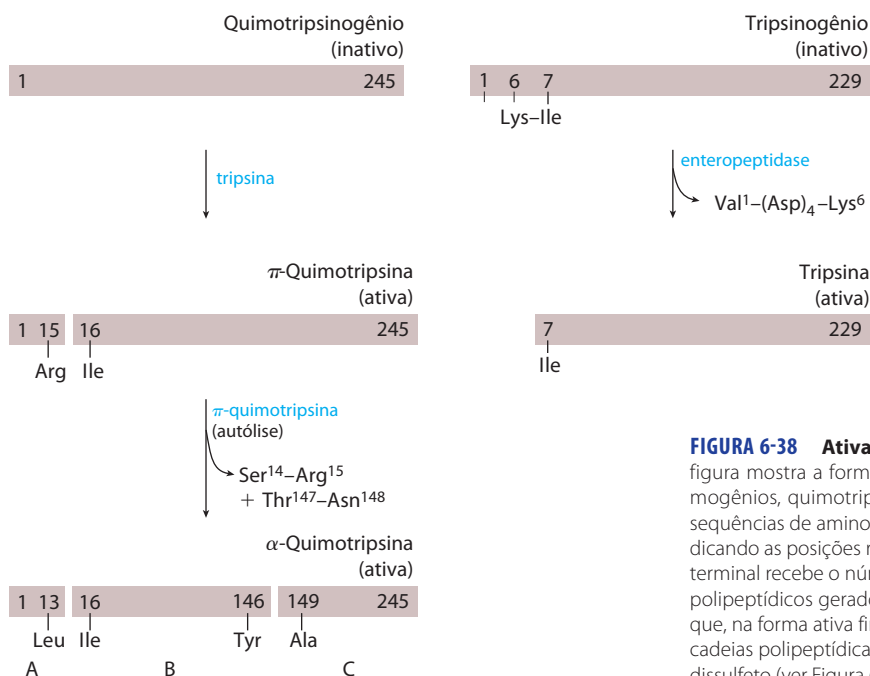



**FIGURA 6-38 Ativação de zimogênios por clivagem proteolítica.** A figura mostra a formação de quimotripsina e tripsina a partir dos seus zimogênios, quimotripsinogênio e tripsinogênio. As barras representam as sequências de aminoácidos das cadeias polipeptídicas, com os números indicando as posições relativas dos resíduos (o resíduo de aminoácido aminoterminal recebe o número 1). Os resíduos nas extremidades dos fragmentos polipeptídicos gerados pela proteólise estão indicados nas barras. Observe que, na forma ativa final, alguns resíduos estão faltando. Lembre que as três cadeias polipeptídicas (A, B e C) da quimotripsina estão unidas por ligações dissulfeto (ver Figura 6-19).

**(a)**

**(b)**

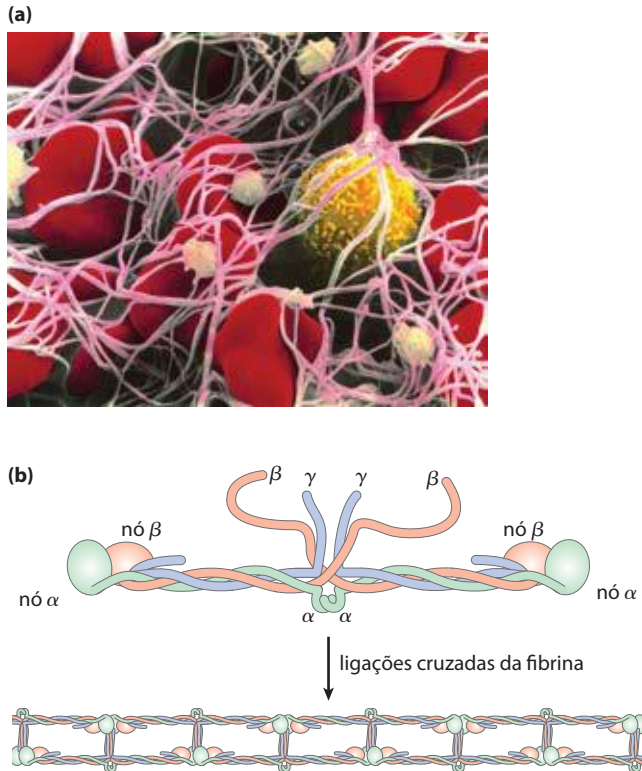



**FIGURA 6-39** **O papel da fibrina na coagulação sanguínea.** (a) O coágulo de sangue consiste em um agregado de plaquetas (células pequenas e coloridas) mantidas coesas por moléculas de fibrina ligadas entre si por ligações cruzadas. Os eritrócitos (vermelho) são também aprisionados na matriz. (b) O fibrinogênio, uma proteína solúvel do plasma sanguíneo, consiste em dois complexos de subunidades $\alpha$, $\beta$ e $\gamma$ ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$). A remoção do peptídeo aminoterminal das subunidades $\alpha$ e $\beta$ (não mostrado) leva à formação de um complexo altamente organizado e com ligações cruzadas covalentes, o que resulta na formação de fibras de fibrina. Os "nós" são domínios globulares nas extremidades resultantes da proteólise das subunidades.

O **fibrinogênio** é um dímero de heterotrímeros ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) com três tipos diferentes, mas evolutivamente relacionados, de subunidades (Figura 6-39b). O fibrinogênio é convertido em fibrina, e desse modo ativado para coagular o sangue, pela remoção proteolítica dos 16 resíduos de aminoácidos das extremidades N-terminais de cada uma das cadeias $\alpha$ e dos 14 resíduos das extremidades N-terminais de cada cadeia $\beta$. A remoção do peptídeo é catalisada pela **trombina**. A nova extremidade N-terminal exposta das subunidades $\alpha$ e $\beta$ se encaixa perfeitamente nos sítios de ligação das porções globulares das extremidades carboxiterminais das subunidades $\gamma$ e $\beta$, respectivamente. As interações são estabilizadas por ligações cruzadas geradas pela condensação de determinados resíduos de Lys de uma subunidade com resíduos de Gln de outra subunidade, catalisada por uma transglutaminase, o **fator XIIIa**. A fibra com ligações cruzadas resultante, a **fibrina**, ajuda a manter o coágulo firme.

A ativação do fibrinogênio, produzindo fibrina, é o ponto final de não apenas uma, mas de duas cascatas regulatórias interligadas (**Figura 6-40**). Uma delas é chamada de via de ativação por contato ("contato" refere-se à interação de componentes-chave desse sistema com fosfolipídeos aniônicos presentes na superfície de plaquetas no local da ferida). Uma vez que todos os componentes dessa via estão presentes no plasma sanguíneo, ela é também chamada de **via intrínseca**. A segunda via é a via tecidual ou **via extrínseca**. Um dos componentes principais dessa via, a proteína **fator tissular** (**TF**) não está presente na corrente sanguínea. A maioria dos fatores proteicos de ambas as vias são designados por números romanos. Muitos desses fatores são serino-proteases semelhantes à quimotripsina, com os zimogênios precursores sintetizados no fígado e exportados para o sangue. Outros fatores são proteínas regulatórias que se ligam às serino-proteases e ajudam a ativá-las.

A coagulação do sangue inicia com a ativação de **plaquetas** – fragmentos celulares especializados sem núcleo – circulantes no local da lesão. Devido ao dano tecidual, as moléculas de colágeno presentes abaixo da camada de células epiteliais que reveste cada vaso sanguíneo tornam-se expostas ao sangue. A ativação das plaquetas é principalmente desencadeada por interação com esse colágeno. A ativação leva à apresentação de fosfolipídeos aniônicos na superfície das plaquetas e à liberação de moléculas sinalizadoras, como as **tromboxanas** (p. 371), que ajudam a estimular a ativação de mais plaquetas. As plaquetas ativadas agregam-se no local da lesão, formando um coágulo frouxo. A estabilização do coágulo agora necessita da fibrina gerada pela cascata da coagulação.

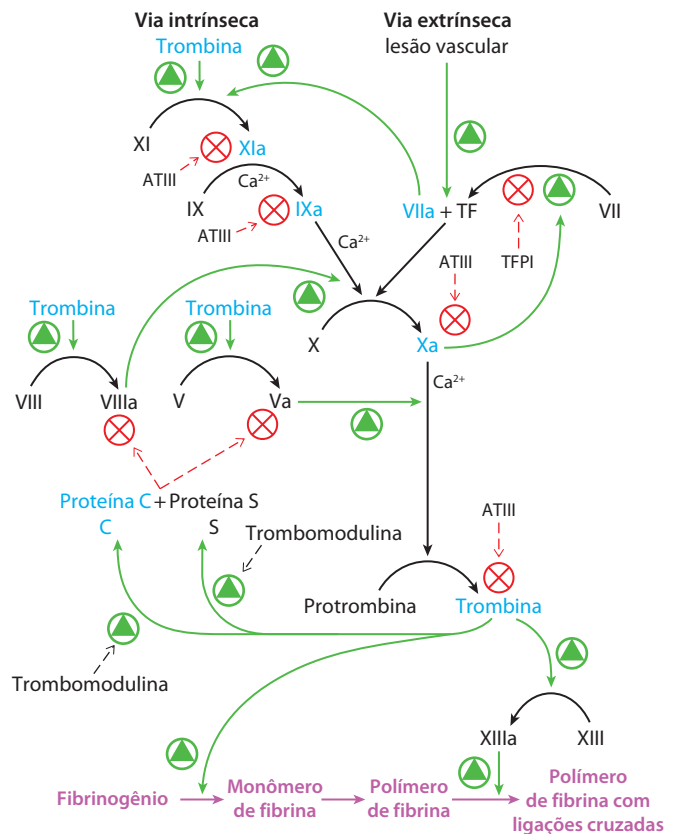



**FIGURA 6-40** **A cascata da coagulação.** As interações cruzadas entre as vias intrínseca e extrínseca levam à clivagem do fibrinogênio levando à formação de trombina ativa, como mostrado. As serino-proteases ativas estão mostradas em azul. As setas verdes indicam etapas de ativação e as setas vermelhas indicam processos inibitórios.

O papel da via extrínseca é o que vem antes. A lesão do tecido expõe o plasma sanguíneo ao TF embebido grandemente nas membranas de fibroblastos e células do músculo liso que estão logo abaixo da camada endotelial. Há a formação de um complexo inicial entre TF e fator VII, presente no plasma sanguíneo. O **fator VII** é um zimogênio de serino-protease e o TF é uma proteína regulatória que é necessária para a função do fator VII. O fator VII é convertido na sua forma ativa, **fator VIIa**, por clivagem proteolítica catalisada pelo **fator Xa** (outra serino-protease). Então o complexo TF-VIIa cliva o **fator X**, criando a sua respectiva forma ativa, fator Xa.

Se TF-VIIa é necessário para clivar X e Xa é necessário para clivar TF-VII, como então se inicia o processo todo? Uma pequena quantidade de fator VIIa está presente no sangue o tempo todo, quantidade suficiente para formar pequenas quantidades do complexo ativo TF-VIIa imediatamente quando da lesão ao tecido. Isso possibilita a formação de fator Xa e estabelece a alça de retroalimentação inicial. Uma vez que os níveis de fator Xa começam a se elevar, o fator Xa (na forma de complexo com a proteína regulatória fator Va) cliva a protrombina na forma ativa trombina e a trombina cliva o fibrinogênio.

A via extrínseca proporciona assim uma eclosão de trombina. Entretanto, o complexo TF-VIIa é rapidamente inativado pela **proteína inibidora de fator tecidual** (**TFPI**). A formação do coágulo é sustentada pela ativação de componentes da via intrínseca. O **fator IX** é convertido na serino-protease ativa **fator IXa** pela protease TF-VIIa durante o início da sequência da coagulação. O fator IXa, complexado com a proteína regulatória **VIIIa**, é relativamente estável e proporciona uma enzima alternativa para a conversão proteolítica do fator X a fator Xa. Fator IXa ativado pode também ser produzido pela serinoprotease fator XIa. A maior parte de XIa é gerada pela clivagem do zimogênio **fator XI** pela trombina, em uma alça de retroalimentação.

Deixada sem controle, a coagulação sanguínea pode acabar bloqueando os vasos sanguíneos, provocando ataque cardíaco. É necessário que haja uma regulação maior ainda. À medida que o coágulo firme (ou coágulo duro) se forma vias regulatórias agem para limitar o tempo durante o qual a cascata da coagulação está ativa. Além de clivar o fibrinogênio, a trombina também forma um complexo com uma proteína embebida na superfície do lado vascular das células endoteliais, a **trombomodulina**. O complexo trombina-trombomodulina cliva o zimogênio da protease **proteína C**. A proteína C ativada, na forma de complexo com uma proteína regulatória (**proteína S**), cliva e inativa os fatores Va e VIIIa, levando à supressão da cascata toda. Outra proteína, **antitrombina III** (**ATIII**), é um inibidor de serino-protease. ATIII forma um complexo covalente 1:1 entre um resíduo de Arg da ATII e o resíduo de Ser do sítio ativo de serino-proteases, especialmente trombina e fator Xa. Esses dois sistemas regulatórios, de forma concatenada com TFPI, ajudam a estabelecer um limiar ou nível de exposição ao TF necessário para ativar a cascata da coagulação. Indivíduos com defeitos genéticos que eliminam ou diminuem os níveis sanguíneos de proteína C ou de ATIII apresentam alto risco de trombose (formação inapropriada de coágulos sanguíneos).

O controle da coagulação sanguínea exerce papéis importantes em medicina, especialmente para evitar que o sangue coagule durante cirurgias e em pacientes com risco de ataque cardíaco ou trombose. Do ponto de vista clínico, várias são as abordagens disponíveis. A primeira aproveita outra característica de várias das proteínas da cascata da coagulação e que não foram ainda consideradas. Os fatores VII, IX, X e a protrombina, juntamente com as proteínas C e S, têm sítios de ligação ao cálcio cruciais a suas respectivas funções. Nesse caso, os sítios de ligação ao cálcio são formados por modificações de vários resíduos de Glu próximos à extremidade N-terminal dessas proteínas transformando-os em resíduos de **$\gamma$-carboxiglutamato** (abreviatura **Gla**; p. 81). A modificação de Glu para Gla é catalisada por enzimas que dependem da atividade da vitamina K, uma vitamina lipossolúvel (p. 374). O cálcio ligado a essas proteínas promove a aderência dessas proteínas a fosfolipídeos aniônicos que aparecem na superfície de plaquetas ativadas, fazendo com que os fatores da coagulação se localizem na área onde o coágulo deve se formar. Antagonistas da vitamina K como a **varfarina** (Coumadina) provaram-se altamente eficientes como anticoagulantes. Uma segunda abordagem para inibir a coagulação é a administração de heparina. **Heparinas** são polissacarídeos altamente sulfatados (ver Figuras 7-22 e 7-23). Elas agem como anticoagulantes por aumentarem a afinidade de ATIII pelo fator Xa e pela trombina, facilitando a inativação desses elementos-chave da cascata. Finalmente, a **aspirina** (ácido acetilsalicílico; p. 845) é eficaz como anticoagulante. A aspirina inibe a enzima cicloxigenase, necessária para a produção de tromboxanas. À medida que a aspirina reduz a liberação de tromboxanas pelas plaquetas, a capacidade de agregação das plaquetas diminui.

Pessoas que nascem com deficiência em componentes da cascata da coagulação têm uma tendência ao sangramento que varia desde leve até essencialmente incontrolável, uma condição fatal. Defeitos genéticos nos genes que codificam para proteínas necessárias para a coagulação sanguínea resultam em doenças conhecidas como hemofilias. A hemofilia A é uma doença ligada ao sexo que resulta da deficiência de fator VIII. Ela é a hemofilia humana mais comum, afetando um em cada 5.000 homens no mundo todo. O exemplo mais famoso de hemofilia A ocorre na nobreza europeia. A rainha Vitória (1819-1901), sem dúvida, foi uma portadora. O príncipe Leopoldo, seu oitavo filho, sofria de hemofilia A e morreu aos 31 anos após sofrer uma pequena queda. Ao menos duas de suas filhas eram portadoras e passaram o gene defeituoso para outras famílias reais europeias (**Figura 6-41**). ■

## Algumas enzimas utilizam vários mecanismos regulatórios

A glicogênio-fosforilase catalisa a primeira reação da via que disponibiliza a glicose armazenada para a via do metabolismo dos carboidratos que produz energia (Capítulos 14 e 15). Essa é uma via metabólica muito importante, e a

sua regulação é correspondentemente complexa. Embora a regulação primária da glicogênio-fosforilase ocorra por modificações covalentes, como foi resumido na Figura 6-36, a glicogênio-fosforilase é também modulada alostericamente, por AMP, que é um ativador da fosforilase *b*, por glicose-6-fosfato e ainda por ATP (ambos inibidores). Além disso, as enzimas que adicionam ou removem grupos fosforil são elas próprias reguladas pelos níveis dos hormônios que regulam os níveis de açúcar no sangue; portanto, todo o sistema é sensível a esses hormônios (**Figura 6-42**; ver também Capítulos 15 e 23).

Outras enzimas com regulação complexa são encontradas em entroncamentos importantes de vias metabólicas. A glutamina-sintetase de bactérias, que catalisa a reação que introduz nitrogênio reduzido no metabolismo celular (Capítulo 22), está entre as enzimas com regulação mais complexa conhecida. Ela é regulada alostericamente (por ao menos oito moduladores diferentes), por modificações covalentes reversíveis e pela associação com outras proteínas regulatórias, mecanismo que será examinado em detalhes quando for estudada a regulação de vias metabólicas específicas.

Qual é a vantagem de tamanha complexidade na regulação da atividade enzimática? Este capítulo foi iniciado enfatizando a importância fundamental da catálise para a existência da vida. O *controle* da catálise também é crucial para a vida. Se todas as possíveis reações de uma célula fossem catalisadas simultaneamente, as macromoléculas e os metabólitos seriam rapidamente degradados em formas químicas muito mais simples. Em vez disso, as células catalisam apenas as reações que necessitam em determinado momento. Quando há abundância de recursos químicos, as células sintetizam e armazenam glicose e outros metabólitos. Quando os recursos químicos são escassos, as células usam essas reservas como combustível para o metabolismo celular. A energia química é usada de forma econômica e parcelada nas várias vias metabólicas de acordo com as necessidades da célula. A disponibilidade de catalisadores poderosos e específicos para cada reação torna possível a regulação dessas reações. Isso, por sua vez, origina a complexa e altamente regulada sinfonia chamada de vida.

## RESUMO 6.5 Enzimas regulatórias

- A atividade das vias metabólicas nas células é regulada pelo controle da atividade de determinadas enzimas.
- A atividade das enzimas alostéricas é ajustada pela ligação reversível de um modulador em um sítio regulatório. O modulador pode ser o próprio substrato ou algum outro metabólito, sendo que os efeitos do modulador podem ser inibitórios ou estimulatórios. O comportamento cinético das enzimas alostéricas reflete interações cooperativas entre as subunidades da enzima.
- Outras enzimas regulatórias são moduladas por modificações covalentes de grupos funcionais específicos que são necessários para a atividade. A fosforilação de resíduos de determinados aminoácidos é uma maneira muito comum de regular a atividade de enzimas.
- Muitas enzimas proteolíticas são sintetizadas como precursores inativos denominados zimogênios, que são ativados por hidrólise, a qual remove pequenos fragmentos peptídicos.
- As enzimas em pontos de cruzamento importantes de vias metabólicas podem ser reguladas por combinações complexas de efetores, permitindo a coordenação das atividades de vias interconectadas.

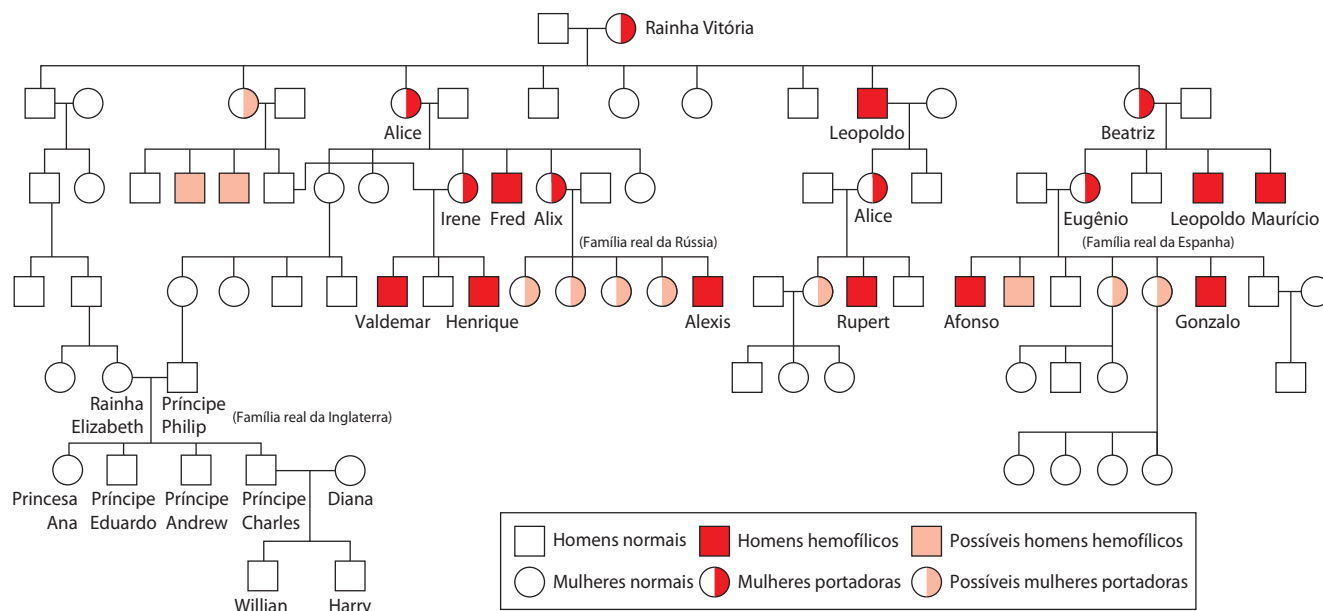



**FIGURA 6-41 Famílias da realeza europeia e a herança da hemofilia A.** Homens estão indicados por quadrados e mulheres por círculos. Homens acometidos de hemofilia estão representados por quadrados vermelhos e as mulheres supostamente portadoras por círculos em bege.

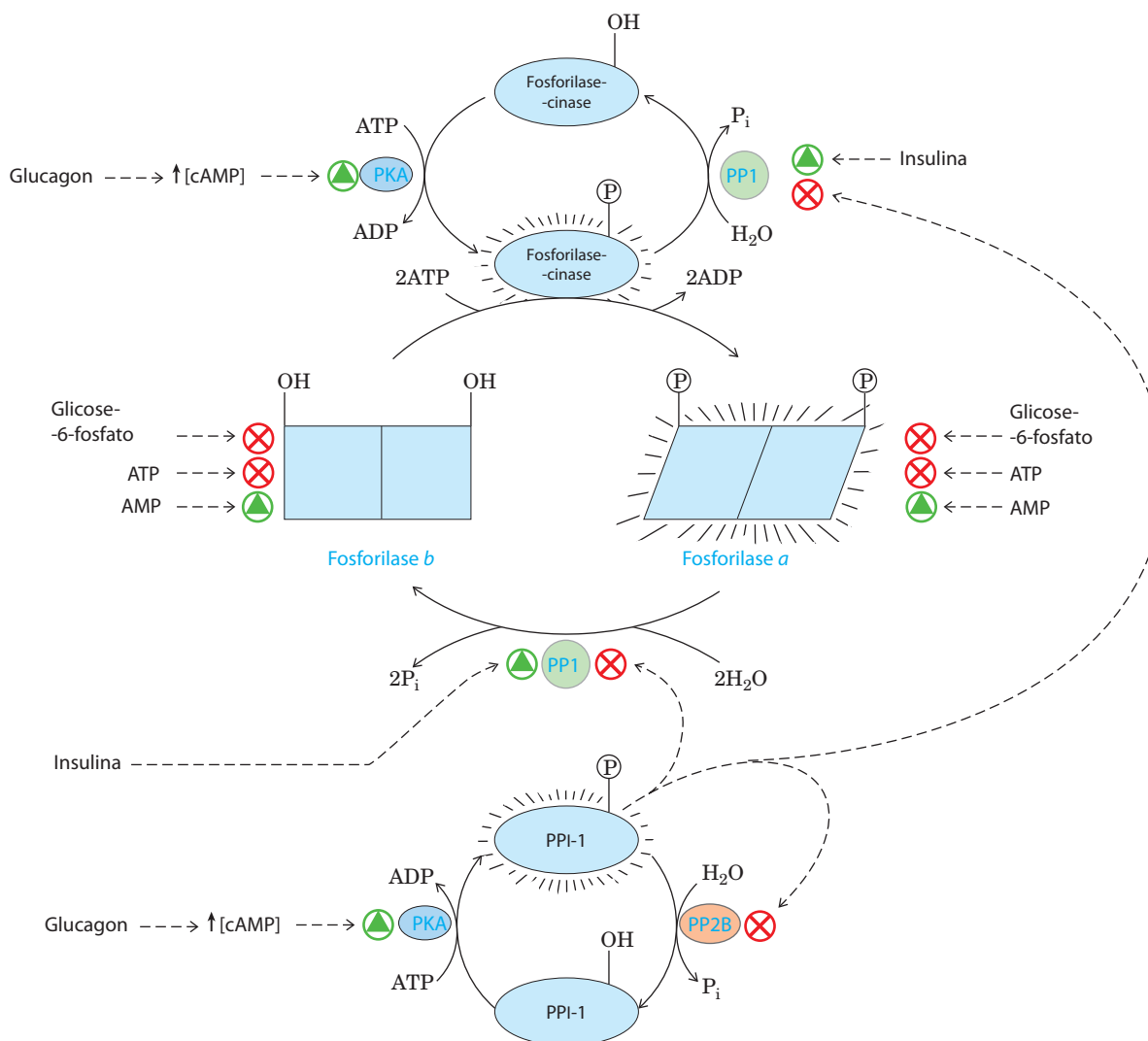



**FIGURA 6-42 Regulação da atividade da glicogênio-fosforilase muscular por fosforilação.** A atividade da glicogênio-fosforilase no músculo é sujeita a um sistema de regulação de vários níveis envolvendo muito mais do que uma modificação covalente (fosforilação), como mostrado na Figura 6-36. A participação da regulação alostérica e uma cascata regulatória sensível ao balanço hormonal que age sobre as enzimas envolvidas na fosforilação e na desfosforilação também exercem um papel importante. A atividade das duas formas da enzima é alostericamente regulada por um ativador (AMP) e por inibidores (glicose-6-fosfato e ATP) que se ligam na enzima a sítios independentes. As atividades da fosforilase-cinase e da fosforilase-fosfatase 1 (PP1) também são reguladas por modificações covalentes por uma via curta que responde aos hormônios glucagon e epinefrina. Um caminho leva à fosforilação da fosforilase-cinase e do inibidor da fosfoproteína-fosfatase 1 (PPI-1). A fosforilase-cinase fosforilada é ativada e, por sua vez, fosforila e ativa a glicogênio-fosforilase. Simultaneamente, a PPI-1 fosforilada interage com a PP1, inibindo-a. A PPI-1 também se mantém ativa (fosforilada) inibindo a fosfoproteína-fosfatase 2B (PP2B), a enzima que a desfosforila (inativando-a). Desse modo, o equilíbrio entre as formas *a* e *b* da glicogênio-fosforilase desloca-se para o lado de mais glicogênio-fosforilase *a* ativa. Observe que as duas formas de fosforilase-cinase são ativadas em certo grau por íons $Ca^{2+}$ (não mostrado). Esta via é discutida com mais detalhes nos Capítulos 14, 15 e 23.

## Termos-chave

*Os termos em negrito estão definidos no glossário.*

**cinética de Michaelis--Menten** 203
**equação de Lineweaver--Burk** 204
**constante de dissociação ($K_d$)** 203
$k_{cat}$ 204
**número de renovação (*turnover*)** 205
**inibição reversível** 207
**inibidor competitivo** 207
**inibidor incompetitivo** 208
**inibidor misto** 208
inibição não competitiva 208
inibidores irreversíveis 210
**inativadores suicidas** 210
**análogo do estado de transição** 210
**serino-proteases** 218
**enzima regulatória** 226
**enzima alostérica** 226
modulador alostérico (efetor alostérico) 226
**proteínas-cinases** 229
**proteína-fosfatases** 229
**zimogênio** 231
pró-proteínas (pró-enzimas) 231
**cascata regulatória** 232
**fibrinogênio** 233
trombina 233
**fibrina** 233
via intrínseca 233
via extrínseca 233
aspirina 234

## Leituras adicionais

### Gerais


Evolution of Catalytic Function (1987) *Cold Spring Harb. Sump. Quant. Biol.* **52**.
Coleção de excelentes artigos sobre os princípios; continua sendo muito útil.

**Fersht, A.** (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, W. H. Freeman and Company, New York.
Uma introdução concisa claramente apresentada. Mais avançado.

**Frey, P.A. & Hegeman, A.D.** (2006) *Enzimatic Reaction Mechanisms*, Oxford University Press, New York.
Fonte competente e atualizada das reações que ocorrem nos sistemas vivos.

**Jencks, W.P.** (1987) *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, Dover Publications, Inc. New York.
Livro importante sobre o assunto. Mais avançado.

**Kornberg, A.** (1989) *For the Love of Emzymes: the Odyssey of a Biochemistry*, Harvard University Press, Cambridge, MA.


### Princípios da catálise


**Amyes, T.L., O'Donoghe, A.C., & Richard, J.P.** (2001) Contribution of phosphate intrinsic binding energy to the enzymatic rate aceleration for triosephosphate isomerase. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 11, 325-11, 326.

**Gutteridge, A. & Thornton, J.M.** (2005) Understanding nature's catalytic toolkit. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 622-629.
Uma boa discussão sobre de onde vem a energia de ligação e como ela é usada.

**Hammes-Schiffer, S. & Benkovic, S.J.** (2006) Relating protein motion to catalysis. *Ann. Rev. Biochem.* **75**, 519-541.
Uma boa descrição sobre a importância do movimento das proteínas na catálise.

**Hansen, D.E. & Raines, R.T.** (1999) Binding energy and enzymatic catalysis. *J. Chem. Edu.* **67**, 483-489.
Uma boa oportunidade para o estudante iniciante melhorar o entendimento dos princípios básicos.

**Harris, T.K. & Turner, G.J.** (2002) Structural basis of perturbed $pK_a$ values of catalytic groups in enzyme active sites. *IUBMB Life* **53**, 85-98.

**Kraut, D.A., Caroll, K.S., & Herschlang, D.** (2003) Challenges in enzyme mechanism and energetics. *Ann. Rev. Biochem.* **72**, 517-571.
Bom resumo sobre os princípios da catálise enzimática da maneira como ela é entendida hoje e sobre o que ainda se desconhece.

**Schramm, V.L.** (1998) Enzymatic transition states and transition state analog design. *Ann. Rev. Biochem.* **67**, 693-720.
Ilustração muito boa dos princípios apresentados neste capítulo.

**Williams, D.H.** (2010) Enzyme catalysis from improved packing in their transition-state structures. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 666–670.

**Wolfenden, R.** (201) Benchmark reaction eras, the stability of biologycal molecules in water, and the evolution of catalytic power in enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* **80**, 645-667.


### Cinética


**Cleland, W.W.** (2002) Enzyme kinectics: steady state. In *Encyclopedia of Life Sciences*, John Willey & Sons, Inc./Willey Interscience, www.els.net
Apresentação clara e concisa dos princípios básicos.

**Raines, R.T. & Hansen, D.E.** (1988) An intuitive approach to steady-state kinetics. *J. Chem. Educ.* **65**, 757-759.


### Exemplos de enzimas


**Babbit, P.C. & Gerit, J.A.** (1997) Understanding enzyme superfamilies: chemistry as the fundamental determinant in the evolution o new catalytic activities. *J. Biol. Chem.* **27**, 30, 591-30, 594.
Descrição interessante da evolução de enzimas com diferentes especificidades catalíticas e o uso de um limitado repertório de motivos estruturais proteicos.

**Babbit, P.C, Hasson, M.S., Wdekind, J.E., Palmer, D.R.J., Barret, W.C., Reed, G.H., Rayment, I., Ringe, D., Kenyon, G.L., & Gerlt, J.A.** (1996) The enolase superfamily: a general strategy for enzyme-catalyzed abstraction of the $\alpha$-protons of carboxylic acids. *Biochemistry*, **35**, 16, 489-1, 501.

**Kirby, A.J.** (2002) The lysozyme mechanism sorted – after 50 years. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 737-739.
Bela discussão sobre o poder catalítico das enzimas e dos princípios envolvidos.


### Enzimas regulatórias


**Chageux, J.-P.** (2012) Allostery nad the Monod-Wyman-Changeux model after 50 years. *Annu. Rev. Biophys.* **41**, 83-113.

**Ehrmann, M. & Clausen, T.** (2004) Proteolysis as a regulatory mechanism. *Ann. Rev. Genet.* **38**, 709-724.

**Hunter, T. & Plownan, G.D.** (1997) The protein kinases of buding yeast: six score and more. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 18-22.
Detalhes sobre a variedade destas importantes enzimas em um modelo eucarioto.

**Johnson, L.N. & Barford, D.** (1993) The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Ann. Revb. Biophys. Biomol. Struct.* **22**, 199-232.


## Problemas

**1. Preservando o sabor doce do milho.** O sabor doce do milho recém-colhido deve-se a um alto conteúdo de açúcar no grão. O milho comprado em mercados (vários dias depois de colhido) não é tão doce porque 50% do açúcar livre é convertido em amido no primeiro dia após a colheita. Para manter a doçura do milho fresco, depois de debulhado o milho pode ser imerso em água fervente por alguns minutos e então resfriado com água fria. O milho processado dessa maneira e mantido congelado mantém a doçura. Qual é a base bioquímica desse processo?

**2. Concentração intracelular das enzimas.** Para ter uma ideia da concentração real das enzimas em uma célula bacteriana, suponha que o citosol da célula contém a mesma concentração de 1.000 enzimas diferentes e que cada proteína tenha uma massa molecular de 100.000. Suponha também que a célula bacteriana seja um cilindro (diâmetro de 1,0 $\mu$m, comprimento de 2,0 $\mu$m), que o citosol (gravidade específica de 1,20) tenha 20% (por peso) de proteínas solúveis e que as proteínas solúveis sejam constituídas apenas de enzimas. Calcule a concentração molar *média* de cada enzima nesta célula hipotética.

**3. Aumento da velocidade pela urease.** A enzima urease aumenta a velocidade da hidrólise da ureia em pH 8,0 e 20°C por um fator de $10^{14}$. Se uma dada quantidade de urease pode hidrolisar completamente certa quantidade de ureia em 5 minutos a 20°C e pH 8,0, quanto tempo levaria para que essa mesma quantidade de ureia fosse hidrolisada sob as mesmas condições na ausência de urease? Suponha que ambas as reações ocorram em sistemas estéreis, de modo que a ureia não possa ser atacada por bactérias.

**4. Proteção das enzimas contra a desnaturação pelo calor.** Quando uma solução de enzima é aquecida, há perda progressiva da atividade catalítica com o tempo, devido à desnaturação da enzima. Uma solução da enzima hexocinase incubada a 45°C perde 50% da atividade em 12 minutos, mas, quando incubada a 45°C na presença de uma grande quantidade de um dos seus substratos, ela perde apenas 3% da atividade em 12 minutos. Sugira uma explicação para a desnaturação térmica da hexocinase retardar quando um dos seus substratos está presente.

**5. Exigências dos sítios ativos das enzimas.** A carboxipeptidase, que remove sequencialmente resíduos de aminoácidos carboxiterminais de substratos peptídicos, é um polipeptídeo único de 307 aminoácidos. Os dois grupos catalíticos essenciais do sítio ativo são fornecidos por $Arg^{145}$ e $Glu^{270}$.

(a) Se a cadeia da carboxipeptidase fosse uma hélice $\alpha$ perfeita, quão distante (em Å) a $Arg^{145}$ estaria do $Glu^{270}$? (Dica: ver Figura 4-4a.)

(b) Explique como então os dois resíduos de aminoácidos podem catalisar uma reação que ocorre em uma distância de poucos ângstroms.

**6. Ensaio quantitativo da lactato-desidrogenase.** A enzima muscular lactato-desidrogenase catalisa a reação

$$CH_3-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-COO^- + NADH + H^+ \longrightarrow CH_3-\overset{\overset{\displaystyle OH}{|}}{\underset{\underset{\displaystyle H}{|}}{C}}-COO^- + NAD^+$$

Piruvato — Lactato

$NADH$ e $NAD^+$ são, respectivamente, a forma reduzida e a forma oxidada da coenzima NAD. Soluções de NADH, *mas não de* $NAD^+$, absorvem luz em 340 nm. Essa propriedade é usada para determinar a concentração de NADH em solução medindo em espectrofotômetro a quantidade de luz absorvida pela solução em 340 nm. Explique como essas propriedades da NADH podem ser usadas para planejar um ensaio quantitativo da lactato-desidrogenase.

**7. Efeito das enzimas sobre as reações.** Quais dos seguintes efeitos ocorreriam se uma enzima catalisasse a reação

$$S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} P \quad \text{quando} \quad K'_{eq} = \frac{[P]}{[S]}$$

(a) Diminuição em $K'_{eq}$; (b) aumento em $k_1$; (c) aumento em $K'_{eq}$; (d) aumento em $\Delta G^\ddagger$; (e) diminuição em $\Delta G^\ddagger$; (f) $\Delta G'^\circ$ mais negativo; (g) aumento de $k_2$.

**8. Relações entre a velocidade da reação e a concentração do substrato: equação de Michaelis-Menten.**

(a) Qual a concentração de substrato para que uma enzima com $k_{cat}$ de 30,0 $s^{-1}$ e $K_m$ de 0,0050 M opere com um quarto da velocidade máxima?

(b) Determine a fração da $V_{máx}$ que seria obtida nas seguintes concentrações de substrato [S]: ½ $K_m$, 2 $K_m$ e 10 $K_m$.

(c) Enzimas que catalisam a reação $X \rightleftharpoons Y$ são isoladas de duas espécies de bactérias. As enzimas possuem mesma $V_{máx}$, mas diferentes valores de $K_m$ para o substrato X. A enzima A tem $K_m$ de 2,0 $\mu$M enquanto a enzima B tem $K_m$ de 0,5 $\mu$M. O gráfico abaixo mostra as cinéticas das reações catalisadas pela mesma concentração de cada uma das enzimas e com [X] = 1 $\mu$M. Qual curva corresponde a cada uma das enzimas?

**9. Aplicação da equação I de Michaelis-Menten.** Um grupo de pesquisadores descobriu uma nova versão da felicidase, que eles denominaram de felicidase*, que catalisa a reação química

$$\text{FELICIDADE} \rightleftharpoons \text{TRISTEZA}$$

Os pesquisadores iniciaram a caracterização da enzima.

(a) No primeiro experimento, com $[E_t]$ de 4 nM, eles observaram que a $V_{máx}$ é 1,6 $\mu$M $s^{-1}$. Com base nesse experimento, qual é o $k_{cat}$ da felicidase*? (Coloque as unidades apropriadas.)

(b) Em outro experimento, com $[E_t]$ de 1 nM de [FELICIDADE] de 30 $\mu$M, os pesquisadores observaram que $V_0$ = 300 nM $s^{-1}$. Qual o $K_m$ medido para a felicidase* para o substrato FELICIDADE? (Coloque as unidades apropriadas.)

(c) Pesquisas posteriores mostraram que a felicidase* purificada que foi usada no primeiro experimento estava contaminada com um inibidor reversível denominado RAIVA. Quando RAIVA foi totalmente removida da preparação de felicidase* e os dois experimentos foram repetidos, a $V_{máx}$ em (a) aumentou para 4,8 $\mu$M $s^{-1}$ e o $K_m$ em (b) passou a 15 $\mu$M. Para a inibição por RAIVA, calcule os valores de $\alpha$ e $\alpha'$.

(d) Com base nas informações dadas, diga qual é o tipo da inibição por RAIVA.

**10. Aplicação da equação II de Michaelis-Menten.** Outra enzima foi encontrada e ela catalisa a reação

$$A \rightleftharpoons B$$

Os pesquisadores verificaram que o $K_m$ para o substrato A é 4 $\mu$M e o $k_{cat}$ é 20 min$^{-1}$.

(a) Em um experimento, [A] = 6 mM e a velocidade inicial, $V_0$, é 480 nM min$^{-1}$. Qual foi a [$E_t$] usada nesse experimento?

(b) Em outro experimento, [$E_t$] = 0,5 $\mu$M e a $V_0$ = 5 $\mu$M min$^{-1}$. Qual a [A] usada no experimento?

(c) Foi verificado que o composto Z é um inibidor competitivo muito potente dessa enzima, com $\alpha$ de 10. Em um experimento com a mesma [$E_t$] usada na parte (a), mas com diferente [A], é adicionada uma quantidade de Z que reduz a velocidade $V_0$ para 240 nM min$^{-1}$. Qual a [A] usada no experimento?

(d) Com base nos parâmetros cinéticos dados, pode-se concluir que essa enzima evoluiu atingindo a perfeição catalítica? Explique brevemente a resposta usando o(s) parâmetro(s) cinético(s) que define(m) a perfeição catalítica.

**11. Estimativa da $V_{máx}$ e do $K_m$ por inspeção.** Embora haja disponibilidade de métodos gráficos para a determinação precisa da $V_{máx}$ e do $K_m$ de uma reação catalisada por enzimas (ver Quadro 6-1), algumas vezes essas grandezas podem ser rapidamente estimadas pelo exame dos valores de $V_0$ aumentando [S]. Estime os valores de $V_{máx}$ e de $K_m$ da reação catalisada por enzima na qual foram obtidos os seguintes dados.

| [S] (M) | $V_0$ ($\mu$M/min) |
|---|---|
| $2,5 \times 10^{-6}$ | 28 |
| $4,0 \times 10^{-6}$ | 40 |
| $1 \times 10^{-5}$ | 70 |
| $2 \times 10^{-5}$ | 95 |
| $4 \times 10^{-5}$ | 112 |
| $1 \times 10^{-4}$ | 128 |
| $2 \times 10^{-3}$ | 139 |
| $1 \times 10^{-2}$ | 140 |

**12. Propriedades de uma enzima da síntese de prostaglandinas.** As prostaglandinas pertencem a uma classe de eicosanoides (derivados de ácidos graxos com uma diversidade de ações extremamente potentes sobre os tecidos de vertebrados). São responsáveis pela produção de febre, inflamação e dores associadas. As prostaglandinas são derivadas do ácido araquidônico, um ácido graxo de 20 carbonos, por uma reação catalisada pela enzima prostaglandina-endoperóxido-sintase. Essa enzima, uma ciclo-oxigenase, utiliza oxigênio para converter ácido araquidônico em $PGG_2$, o precursor direto de muitas prostaglandinas diferentes (a síntese das prostaglandinas está descrita no Capítulo 21).

(a) Os dados cinéticos abaixo são de uma reação catalisada pela prostaglandina-endoperóxido-sintase. Focando nas primeiras duas colunas, determine $V_{máx}$ e $K_m$ da enzima.

| [Ácido araquidônico] (mM) | Velocidade de formação de $PGG_2$ (mM/min) | Velocidade de formação de $PGG_2$ em presença de 10 mg/mL de ibuprofeno (mM/min) |
|---|---|---|
| 0,5 | 23,5 | 16,67 |
| 1,0 | 32,2 | 25,25 |
| 1,5 | 36,9 | 30,49 |
| 2,5 | 41,8 | 37,04 |
| 3,5 | 44,0 | 38,91 |

(b) Ibuprofeno é um inibidor da prostaglandina-endoperóxido-sintase. Ao inibir a síntese das prostaglandinas, o ibuprofeno reduz a inflamação e a dor. Utilizando os dados da primeira e da terceira coluna da tabela acima, determine o tipo de inibição que o ibuprofeno provoca na endoperóxido-sintase.

**13. Análise gráfica da $V_{máx}$ e do $K_m$.** Os seguintes dados foram obtidos em experimentos feitos durante um estudo sobre a atividade de uma peptidase intestinal sobre o substrato glicilglicina.

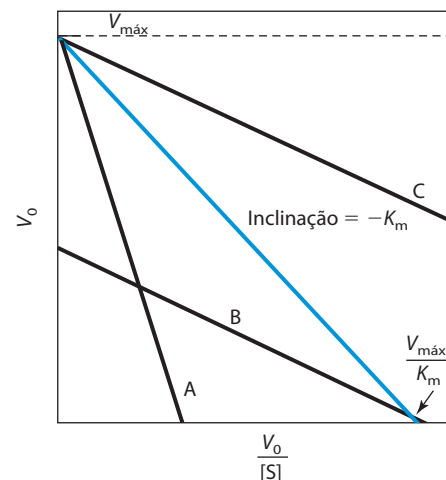
$$\text{Glicilglicina} + H_2O \rightarrow 2\ \text{glicina}$$

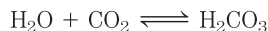
| [S] (mM) | Produto formado ($\mu$mol/min) |
|---|---|
| 1,5 | 0,21 |
| 2,0 | 0,24 |
| 3,0 | 0,28 |
| 4,0 | 0,33 |
| 8,0 | 0,40 |
| 16,0 | 0,45 |

Use a análise gráfica (ver Quadro 6-1 e o gráfico interativo associado) para determinar o $K_m$ e a $V_{máx}$ desta preparação de enzima sobre esse substrato.

**14. Equação de Eadie-Hofstee.** Existem várias maneiras de transformar a equação de Michaelis-Menten e fazer gráficos com os dados, cada uma delas com diferentes vantagens, dependendo do conjunto de dados a ser analisado. Uma das transformações da equação de Michaelis-Menten é a equação de Lineweaver-Burk, ou de duplo-recíproco. Multiplicando ambos os lados da equação de Lineweaver-Burk por $V_{máx}$ e rearranjando, obtém-se a equação de Eadie-Hofstee:

$$V_0 = (-K_m)\frac{V_0}{[S]} + V_{máx}$$

Um gráfico de $V_0$ *versus* $V_0$/[S] para uma reação catalisada por uma enzima está mostrado a seguir. A curva azul foi obtida na ausência de inibidor. Quais das outras curvas (A, B ou C) mostram a atividade da enzima quando um inibidor competitivo é adicionado à mistura de reação? Dica: Ver Equação 6-30.

**15. O número de renovação da anidrase carbônica.** A anidrase carbônica dos eritrócitos ($M_r$ 30.000) tem um dos números de renovação mais altos conhecidos. Ela catalisa a hidratação reversível do $CO_2$:

$$H_2O + CO_2 \rightleftharpoons H_2CO_3$$

Este é um processo importante no transporte de $CO_2$ dos tecidos para os pulmões. Se 10,0 $\mu$g de anidrase carbônica pura catalisam a hidratação de 0,30 g de $CO_2$ em 1 min a 37°C em $V_{máx}$, qual é o número de renovação ($k_{cat}$) da anidrase carbônica (em unidades de $min^{-1}$)?

**16. Dedução da equação de equilíbrio da inibição competitiva.** A equação de velocidade de uma enzima sujeita à inibição competitiva é

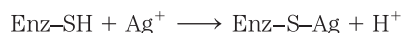
$$V_0 = \frac{V_{máx}[S]}{\alpha K_m + [S]}$$

Iniciando com uma nova definição de enzima total como

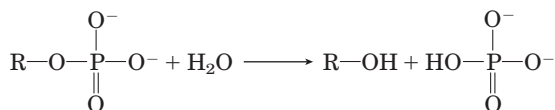
$$[E_t] = [E] + [ES] + [EI]$$

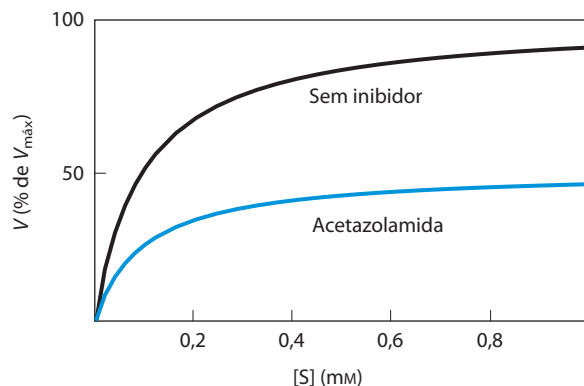
e as definições de $\alpha$ e $K_i$ fornecidas no texto, deduza a equação de velocidade acima. Use a derivação da equação de Michaelis-Menten como um guia.

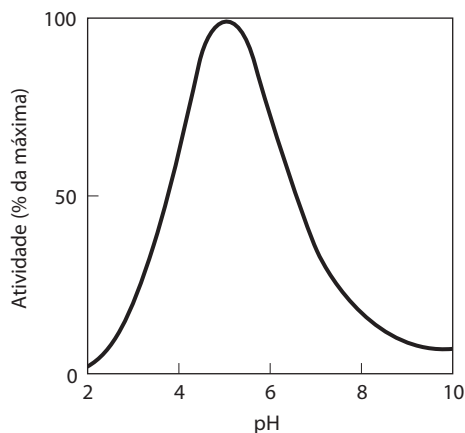
**17. Inibição irreversível das enzimas.** Muitas enzimas são inibidas irreversivelmente por íons de metais pesados como $Hg^{2+}$, $Cu^{2+}$ ou $Ag^+$, que podem reagir com grupos sulfidril para formar mercaptanas:

$$\text{Enz–SH} + Ag^+ \longrightarrow \text{Enz–S–Ag} + H^+$$

A afinidade de $Ag^+$ por grupos sulfidril é tão grande que $Ag^+$ pode ser utilizado para titular quantitativamente grupos –SH. A 10,0 mL de uma solução contendo 1,0 mg/mL de enzima pura, um pesquisador adicionou uma quantidade de $AgNO_3$ suficiente para inativar completamente a enzima, no total de 0,342 $\mu$mol de $AgNO_3$. Calcule a massa molecular mínima da enzima. Por que o valor obtido dessa maneira pode dar apenas a massa molecular *mínima*?

**18. Aplicações clínicas de diferentes inibidores de enzimas.** O soro humano contém uma classe de enzimas conhecidas como fosfatases ácidas. Elas hidrolisam ésteres de fosfato biológicos sob condições levemente ácidas (pH 5,0):

$$R—O—P(=O)(O^-)—O^- + H_2O \longrightarrow R—OH + HO—P(=O)(O^-)—O^-$$

As fosfatases ácidas são produzidas por eritrócitos, pelo fígado, pelos rins, pelo baço e pela glândula da próstata. A enzima da próstata tem importância clínica porque um aumento da sua atividade no sangue pode ser um indicativo de câncer de próstata. A fosfatase da próstata é inibida fortemente pelo íon tartarato, enquanto as fosfatases dos outros tecidos não. Como essa informação pode ser usada para desenvolver uma metodologia para medir a atividade da fosfatase ácida prostática no sangue?

**19. Inibição da anidrase carbônica por acetazolamida.** A anidrase carbônica é fortemente inibida pelo fármaco acetazolamida, utilizado como diurético (i.e., para aumentar a produção de urina) e para diminuir a pressão excessivamente alta no olho (devido ao acúmulo de fluido intraocular) no glaucoma. A anidrase carbônica tem um papel importante nesse e em outros processos de secreção, pois participa na regulação do pH e do conteúdo de bicarbonato de vários fluidos corporais. A curva experimental da velocidade inicial (como porcentagem de $V_{máx}$) dessa reação da anidrase carbônica *versus* [S] está ilustrada abaixo (curva superior). Quando o experimento é repetido na presença de acetazolamida, é obtida a curva inferior. A partir da inspeção das curvas e do seu conhecimento das propriedades cinéticas de inibidores competitivos e mistos, determine a natureza da inibição por acetazolamida. Explique o raciocínio usado.

**20. Efeitos dos inibidores reversíveis.** Derive a expressão do efeito de um inibidor reversível sobre o $K_m$ observado ($K_m$ aparente = $\alpha K_m/\alpha'$). Inicie com a Equação 6-30 e o conceito de que o $K_m$ aparente é equivalente a [S] quando $V_0 = V_{máx}/2\alpha'$.

**21. pH ótimo da lisozima.** O sítio ativo da lisozima contém dois resíduos de aminoácidos essenciais para a catálise: $Glu^{35}$ e $Asp^{52}$. Os valores de p$K_a$ dos carboxilas das cadeias laterais desses resíduos são 5,9 e 4,5, respectivamente. Qual é o estado de ionização (protonado ou desprotonado) de cada resíduo em pH 5,2, o pH ótimo da lisozima? Como os estados de ionização desses resíduos podem explicar o perfil pH-atividade da lisozima mostrado a seguir?

**22. Trabalhando com cinética.** Vá para o gráfico interativo do Capítulo 6.

(a) Usando o gráfico interativo da Equação 6-9, crie um gráfico *V versus* [S]. Use $V_{máx}$ = 100 $\mu$M $s^{-1}$ e $K_m$ = 10 $\mu$M. Quanto $V_0$ aumenta quando [S] duplica, de 0,2 para 0,4 $\mu$M? Qual o $V_0$ quando [S] = 10 $\mu$M? Quanto aumenta $V_0$ quando [S] aumenta de 100 para 200 $\mu$M? Observe como o gráfico muda quando os valores de $V_{máx}$ ou de $K_m$ diminuem pela metade ou duplicam.

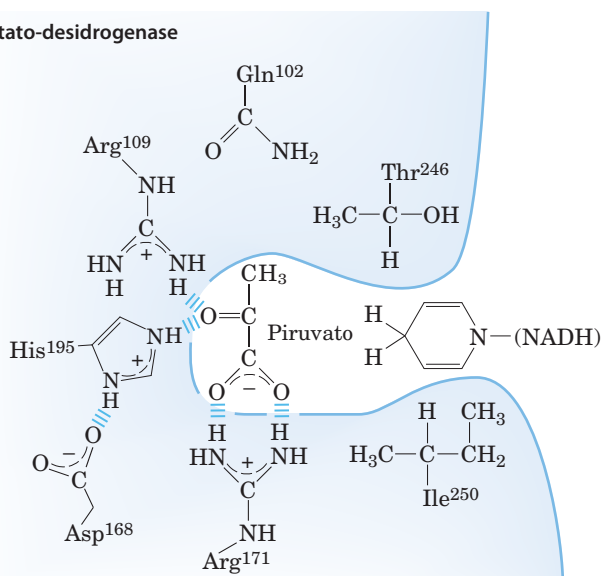
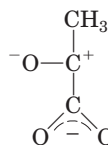
(b) Usando o gráfico interativo para a Equação 6-30 e os parâmetros cinéticos em (a), crie um gráfico no qual tanto $\alpha$ como $\alpha'$ são 1,0. Observe agora como o gráfico muda quando $\alpha$ = 2,0; quando $\alpha'$ = 3,0; e quando $\alpha$ = 2,0 e $\alpha'$ = 3,0.

(c) Usando o gráfico interativo para a Equação 6-30 e a equação de Lineweaver-Burk do Quadro 6-1, crie um gráfico de Lineweaver-Burk (duplo-recíproco) para todos os casos em (a) e (b). Quando $\alpha = 2{,}0$, a intersecção de $x$ desloca-se para a direita ou para a esquerda? Se $\alpha = 2{,}0$ e $\alpha' = 3{,}0$, a intersecção de $x$ desloca-se para a direita ou para a esquerda?

## Problema de análise de dados

**23. Explorando e modificando a lactato-desidrogenase.** O exame da estrutura das enzimas leva a hipóteses sobre as relações entre os diferentes aminoácidos da estrutura proteica e a função da proteína. Uma maneira de testar essas hipóteses é usar a tecnologia do DNA recombinante para gerar versões mutantes da enzima, e então examinar a estrutura e a função dessas formas alteradas. A tecnologia utilizada para isso está descrita no Capítulo 9.

Um exemplo desse tipo de análise é o trabalho de A. R. Clarke e colegas sobre a enzima lactato-desidrogenase, publicado em 1989. A lactato-desidrogenase (LDH) catalisa a redução do piruvato por NADH, formando lactato (ver Seção 14.3). Um esquema do sítio ativo da enzima é mostrado a seguir, com o piruvato no centro.

Lactato-desidrogenase

O mecanismo de reação é similar a muitas reduções de NADH (Figura 13-24). De maneira geral, ele é o inverso das etapas ❷ e ❸ mostradas na Figura 14-8. O estado de transição envolve um grupo carboxil fortemente polarizado da molécula do piruvato, conforme mostrado a seguir:

(a) Uma forma mutante da LDH na qual a Arg$^{109}$ foi substituída por Gln apresenta apenas 5% da ligação ao piruvato e 0,07% da atividade da enzima do tipo selvagem. Elabore uma explicação plausível para os efeitos dessa mutação.

(b) A forma mutante da LDH na qual a Arg$^{171}$ foi substituída por Lys apresenta apenas 0,05% do nível de ligação ao substrato da enzima do tipo selvagem. Por que esse drástico efeito causa surpresa?

(c) Na estrutura cristalina da LDH, o grupo guanidino da Arg$^{171}$ e o grupo carboxil do piruvato são alinhados em uma configuração bifurcada coplanar, como mostrado. Com base nessa informação, elabore uma explicação plausível para o efeito dramático da substituição da Arg$^{171}$ por Lys.

(d) Uma forma mutante da LDH na qual a Ile$^{250}$ foi substituída por Gln mostra uma ligação diminuída com NADH. Elabore uma explicação plausível para esse resultado.

Clarke e colegas também prepararam uma versão mutante da LDH que ligaria e reduziria o oxaloacetato no lugar do piruvato. Eles fizeram uma única substituição, trocando Gln$^{102}$ por Arg. A enzima resultante reduz oxaloacetato a malato e não consegue mais reduzir piruvato a lactato. Portanto, a LDH é convertida em malato-desidrogenase.

(e) Faça um esquema do sítio ativo deste mutante da LDH com oxaloacetato ligado.

(f) Por que essa enzima mutante usa agora oxaloacetato como substrato em vez de piruvato?

(g) Os autores ficaram surpresos com o fato de que a substituição por um aminoácido maior no sítio ativo possibilita a ligação de um substrato maior. Formule uma explicação plausível para esse resultado.

### Referências

**Clarke, A.R., Atkinson, T., & Holbrook, J.J.** (1989) From analysis to synthesis: new ligant binding sites on the lactate dehydrogenase framework, Part I. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 101-105.

**Clarke, A.R. Atkinson, T., & Holbrook, J.J.** (1989) From analysis to synthesis: new ligant binding sites on the lactate dehydrogenase framework, Part II. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 145-148.

7

# Carboidratos e Glicobiologia



Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na Terra. A cada ano, a fotossíntese converte mais de 100 bilhões de toneladas métricas de $CO_2$ e $H_2O$ em celulose e outros produtos vegetais. Alguns carboidratos (açúcar e amido) são os principais elementos da dieta em muitas partes do mundo, e sua oxidação é a principal via de produção de energia na maioria das células não fotossintéticas. Polímeros de carboidratos (também chamados de glicanos) agem como elementos estruturais e protetores nas paredes celulares bacterianas e vegetais e também nos tecidos conectivos animais. Outros polímeros de carboidratos lubrificam as articulações e auxiliam o reconhecimento e a adesão intercelular. Polímeros de carboidratos complexos covalentemente ligados a proteínas ou lipídeos atuam como sinais que determinam a localização intracelular ou o destino metabólico dessas moléculas híbridas, chamadas de **glicoconjugados**. Este capítulo introduz as principais classes de carboidratos e glicoconjugados e traz alguns exemplos de seus muitos papéis estruturais e funcionais.

**Carboidratos** são poli-hidroxialdeídos ou poli-hidroxicetonas, ou substâncias que geram esses compostos quando hidrolisadas. Muitos carboidratos têm a fórmula empírica $(CH_2O)_n$; alguns também contêm nitrogênio, fósforo ou enxofre.

Existem três classes principais de carboidratos: monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos (a palavra "sacarídeo" é derivada do grego *sakcharon*, que significa "açúcar"). Os **monossacarídeos**, ou açúcares simples, são constituídos por uma única unidade poli-hidroxicetona ou poli-hidroxialdeído. O monossacarídeo mais abundante na natureza é o açúcar de 6 carbonos D-glicose, algumas vezes chamado de dextrose. Monossacarídeos de quatro ou mais carbonos tendem a formar estruturas cíclicas.

Os **oligossacarídeos** consistem em cadeias curtas de unidades de monossacarídeos, ou resíduos, unidas por ligações características chamadas de ligações glicosídicas. Os mais abundantes são os **dissacarídeos**, com duas unidades de monossacarídeos. Um dissacarídeo típico é a sacarose (açúcar de cana), constituído pelos açúcares de seis carbonos D-glicose e D-frutose. Todos os monossacarídeos e dissacarídeos comuns têm nomes terminados com o sufixo "-ose". Em células, a maioria dos oligossacarídeos constituídos por três ou mais unidades não ocorre como moléculas livres, mas sim ligada a moléculas que não são açúcares (lipídeos ou proteínas), formando glicoconjugados.

Os **polissacarídeos** são polímeros de açúcar que contêm mais de 20 unidades de monossacarídeo; alguns têm centenas ou milhares de unidades. Alguns polissacarídeos, como a celulose, têm cadeias lineares; outros, como o glicogênio, são ramificados. Ambos são formados por unidades repetidas de D-glicose, mas diferem no tipo de ligação glicosídica e, em consequência, têm propriedades e funções biológicas notavelmente diferentes.

## 7.1 Monossacarídeos e dissacarídeos

Os mais simples dos carboidratos, os monossacarídeos, são aldeídos ou cetonas com dois ou mais grupos hidroxila; os monossacarídeos de seis carbonos, glicose e frutose, têm cinco grupos hidroxila. Muitos dos átomos de carbono aos quais os grupos hidroxila estão ligados são centros quirais, o que origina os muitos estereoisômeros de açúcares encontrados na natureza. Esse estereoisomerismo é biologicamente importante porque as enzimas que agem sobre os açúcares são absolutamente estereoespecíficas, normalmente preferindo um estereoisômero a outro por três ou mais ordens de magnitude, como demonstrado pelos seus valores de $K_m$ ou constantes de ligação. É tão difícil encaixar o estereisômero errado dentro do sítio de ligação de uma enzima quanto é difícil colocar a sua luva esquerda na sua mão direita.

Inicialmente são descritas as famílias de monossacarídeos com esqueletos de três a sete carbonos – suas estruturas, as formas estereoisoméricas e os meios para representar as estruturas tridimensionais no papel. Depois são discutidas algumas reações químicas dos grupos carbonil de monossacarídeos. Uma dessas reações, a adição de um grupo hidro-

xila que é parte da mesma molécula, gera formas cíclicas com esqueletos de quatro ou mais carbonos (as formas que predominam em solução aquosa). O fechamento desse anel cria um novo centro quiral, adicionando ainda mais complexidade a essa classe de compostos. A nomenclatura para especificar sem ambiguidades a configuração de cada átomo de carbono em uma forma cíclica e os meios para representar essas estruturas no papel são, portanto, descritos com alguns detalhes; essas informações serão úteis quando for discutido o metabolismo dos monossacarídeos na Parte II deste livro. São apresentados também alguns importantes derivados de monossacarídeos encontrados em capítulos posteriores.

## As duas famílias de monossacarídeos são aldoses e cetoses

Os monossacarídeos são sólidos cristalinos e incolores plenamente solúveis em água, mas insolúveis em solventes apolares. A maioria tem sabor adocicado (ver Quadro 7-2, p. 254). Os esqueletos dos monossacarídeos comuns são compostos por cadeias de carbono não ramificadas, nas quais todos os átomos de carbono estão unidos por ligações simples. Nessa forma de cadeia aberta, um dos átomos de carbono está ligado duplamente a um átomo de oxigênio, formando um grupo carbonil; os outros átomos de carbono estão ligados, cada um, a um grupo hidroxila. Quando o grupo carbonil está na extremidade da cadeia de carbonos (isto é, em um grupo aldeído), o monossacarídeo é uma **aldose**; quando o grupo carbonil está em qualquer outra posição (em um grupo cetona), o monossacarídeo é uma **cetose**. Os monossacarídeos mais simples são as duas trioses de três carbonos: gliceraldeídos (aldotrioses) e di-hidroxiacetonas (cetotrioses, ver **Figura 7-1a**).

Monossacarídeos com quatro, cinco, seis e sete átomos de carbono no esqueleto são chamados, respectivamente, de tetroses, pentoses, hexoses e heptoses. Existem aldoses e cetoses para cada um desses comprimentos de cadeia: aldotetroses e cetotetroses, aldopentoses e cetopentoses, e assim por diante. As hexoses, que incluem a aldo-hexose D-glicose e a ceto-hexose D-frutose (Figura 7-1b), são os monossacarídeos mais comuns na natureza – os produtos da fotossíntese e os intermediários-chave das sequências de reações produtoras de energia centrais da maioria dos organismos. As aldopentoses D-ribose e 2-desóxi-D-ribose (Figura 7-1c) são componentes dos nucleotídeos e dos ácidos nucleicos (Capítulo 8).

## Monossacarídeos têm centros assimétricos

Todos os monossacarídeos, com exceção da di-hidroxiacetona, contêm um ou mais átomos de carbono assimétricos (quirais) e, portanto, ocorrem em formas isoméricas opticamente ativas (p. 17-18). A aldose mais simples, o gliceraldeído, contém um centro quiral (o átomo de carbono central) e assim tem dois isômeros ópticos diferentes, ou **enantiômeros** (**Figura 7-2**).

**CONVENÇÃO-CHAVE:** Um dos dois enantiômeros do gliceraldeído é, por convenção, designado isômero D, e o outro é isômero L. Assim como para outras biomoléculas com centros quirais, as configurações absolutas dos açúcares são conhecidas a partir de cristalografia por raios X. Para representar estruturas tridimensionais de açúcares no papel, em geral são utilizadas as **fórmulas de projeção de Fischer** (Figura 7-2). Nas fórmulas de projeção de Fischer, as ligações horizontais se projetam para fora do plano do papel, em direção ao leitor; as ligações verticais se projetam para trás do plano do papel, distanciando-se do leitor. ■

Geralmente, uma molécula com $n$ centros quirais pode ter $2^n$ estereoisômeros. O gliceraldeído tem $2^1 = 2$; as aldo-hexoses, com quatro centros quirais, têm $2^4 = 16$. Para cada um dos comprimentos de cadeia carbônica, os estereoisômeros dos monossacarídeos podem ser divididos em dois grupos, os quais diferem quanto à configuração do centro quiral *mais distante* do carbono do carbonil. Aqueles nos quais a configuração desse carbono de referência é a mesma daquela do D-gliceraldeído são designados isômeros D, e aqueles com a mesma configuração do L-gliceraldeído são isômeros L. Em outras palavras, quando o grupo

D-Gliceraldeído, aldotriose
Di-hidroxiacetona, cetotriose
(a)
D-Glicose, aldo-hexose
D-Frutose, ceto-hexose
(b)
D-Ribose, aldopentose
2-Desóxi-D-ribose, aldopentose
(c)

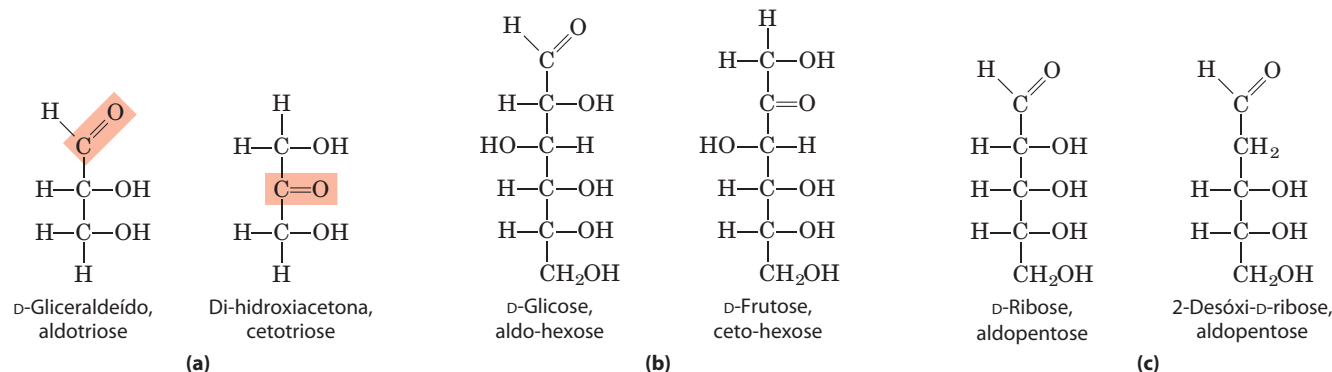
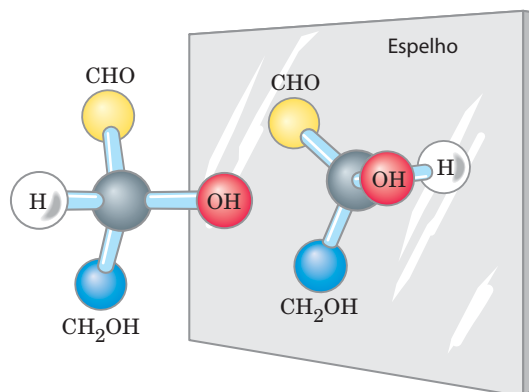



**FIGURA 7-1 Monossacarídeos representativos. (a)** Duas trioses, uma aldose e uma cetose. O grupo carbonil em cada molécula está sombreado. **(b)** Duas hexoses comuns. **(c)** As pentoses componentes de ácidos nucleicos. A D-ribose é um componente do ácido ribonucleico (RNA) e a 2-desóxi-D-ribose é um componente do ácido desoxirribonucleico (DNA).

Modelos em esfera e bastão

Fórmulas de projeção de Fischer

Fórmulas em perspectiva

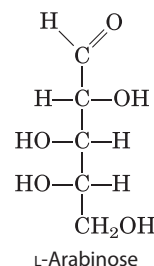
**FIGURA 7-2 Três maneiras para representar os dois enantiômeros do gliceraldeído.** Os enantiômeros são imagens especulares um do outro. Modelos de esfera e bastão mostram a verdadeira configuração das moléculas. Lembre-se de que, nas fórmulas em perspectiva, a extremidade larga da cunha sólida projeta-se para fora do plano do papel, em direção ao leitor; na cunha descontínua, ela se estende para trás (ver Figura 1-18).

hidroxila do carbono de referência está à direita (*dextro*) em uma fórmula de projeção que apresenta o carbono do carbonil no topo, o açúcar é o isômero D; quando está à esquerda (*levo*), é o isômero L. Das 16 aldo-hexoses possíveis, oito estão na forma D e oito na forma L. Em sua maioria as hexoses dos organismos vivos são isômeros D. Por que isômeros D? Uma questão interessante, e sem resposta. Lembre que todos os aminoácidos encontrados nas proteínas são exclusivamente um dos dois isômeros possíveis, L. A base para essa preferência inicial por um dos isômeros durante a evolução também é desconhecida; entretanto, uma vez que um isômero tenha sido selecionado, é provável que as enzimas em evolução retenham a preferência por aquele estereoisômero (p. 78).

A **Figura 7-3** apresenta as estruturas dos estereoisômeros D de todas as aldoses e cetoses que têm de três a seis átomos de carbono. Os carbonos de um açúcar começam a ser numerados a partir da extremidade da cadeia mais próxima ao grupo carbonil. Cada uma das oito D-aldo-hexoses, que diferem em estereoquímica em C-2, C-3 ou C-4, tem nome próprio: D-glicose, D-galactose, D-manose e assim por diante (Figura 7-3a). As cetoses de quatro e cinco carbonos são nomeadas pela inserção de "ul" ao nome da aldose correspondente; por exemplo, D-ribulose é a cetopentose que corresponde à aldopentose D-ribose. (A importância da ribulose será discutida no estudo da fixação do $CO_2$ atmosférico pelas plantas, no Capítulo 20.) As ceto-hexoses são nomeadas de maneira diferente: por exemplo, frutose (do latim *fructus*, "fruto"; frutas são uma das fontes desse açúcar) e sorbose (de *Sorbus*, o gênero da sorveira, planta cujos frutos são ricos em álcool-açúcar sorbitol). Dois açúcares que diferem apenas na configuração de um carbono são chamados de **epímeros**; D-glicose e D-manose, que diferem apenas na estequiometria do C-2, são epímeros, assim como D-glicose e D-galactose (que diferem em C-4, ver **Figura 7-4**).

Alguns açúcares ocorrem naturalmente na forma L; exemplos são L-arabinose e os isômeros L de alguns derivados de açúcar que comumente compõem glicoconjugados (Seção 7.3).

H    O
C
H—C—OH
HO—C—H
HO—C—H
$CH_2OH$

L-Arabinose

## Os monossacarídeos comuns têm estruturas cíclicas

Por simplicidade, até este momento foram representadas as estruturas de aldoses e cetoses como moléculas de cadeia aberta (Figuras 7-3 e 7-4). Na verdade, em solução aquosa, as aldotetroses e todos os monossacarídeos com cinco ou mais átomos de carbono no esqueleto ocorrem predominantemente como estruturas cíclicas (em anel), nas quais o grupo carbonil está formando uma ligação covalente com o oxigênio de um grupo hidroxila presente na cadeia. A formação dessas estruturas em anel é o resultado de uma reação geral entre álcoois e aldeídos ou cetonas para formar derivados chamados de **hemiacetais** ou **hemicetais**. Duas moléculas de um álcool podem ser adicionadas ao carbono do carbonil; o produto da primeira adição é um hemiacetal (quando adicionado a uma aldose) ou um hemicetal (quando adicionado a uma cetose). Se os grupos —OH e carbonil vierem da mesma molécula, o resultado será um anel com cinco ou seis membros. A adição de uma segunda molécula de álcool produz o acetal ou cetal completo (**Figura 7-5**), e a ligação formada é uma ligação glicosídica. Quando as duas moléculas reagentes forem monossacarídeos, o acetal ou cetal formado será um dissacarídeo.

A reação com a primeira molécula de álcool cria um centro quiral adicional (o carbono do carbonil). Como o álcool pode ser adicionado de duas maneiras diferentes, atacando a "frente" ou as "costas" do carbono do carbonil, a reação pode produzir qualquer uma de duas configura-

**(a) D-Aldoses**

**Três carbonos**

**Quatro carbonos**

D-Eritrose D-Treose

**Cinco carbonos**

D-Ribose D-Arabinose D-Xilose D-Lixose

**Seis carbonos**

D-Alose D-Altrose D-Glicose D-Manose D-Gulose D-Idose D-Galactose D-Talose

**(b) D-Cetoses**

**Três carbonos**

**Quatro carbonos**

D-Eritrulose

**Cinco carbonos**

D-Ribulose D-Xilulose

**Seis carbonos**

D-Psicose D-Frutose D-Sorbose D-Tagatose

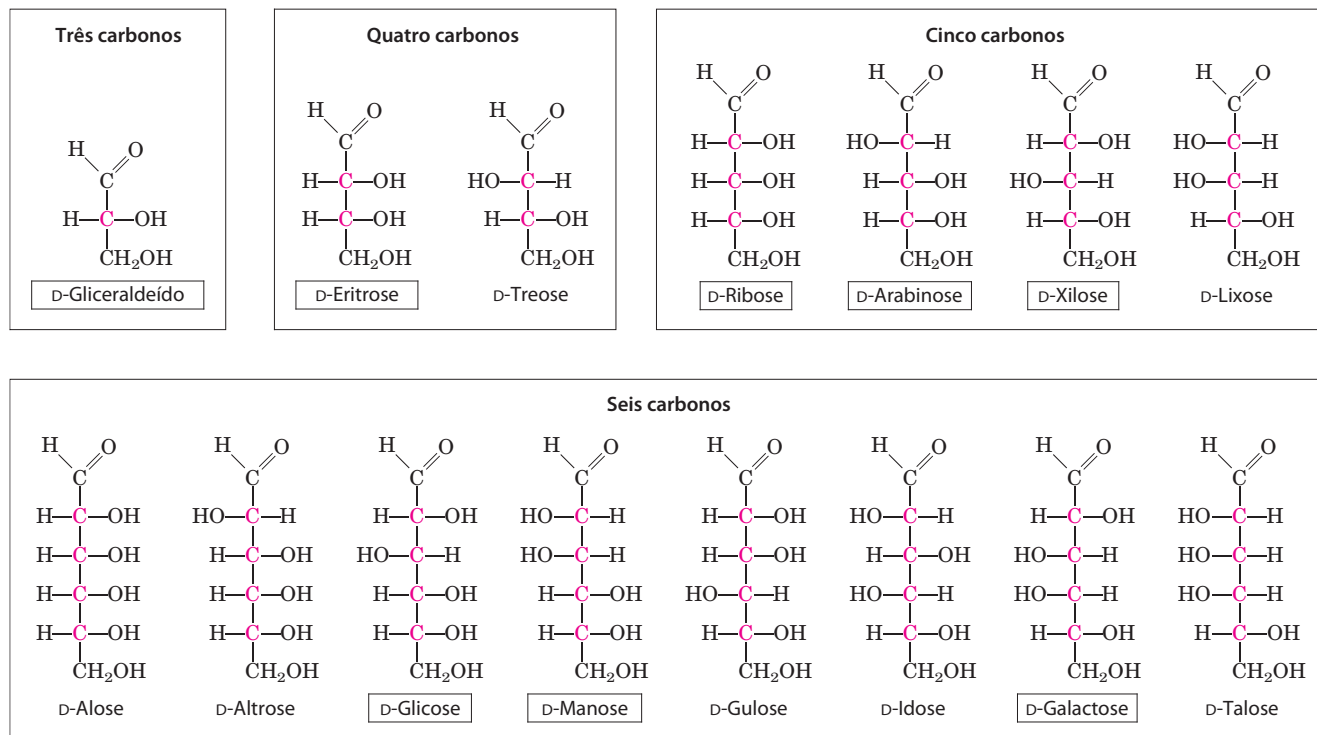
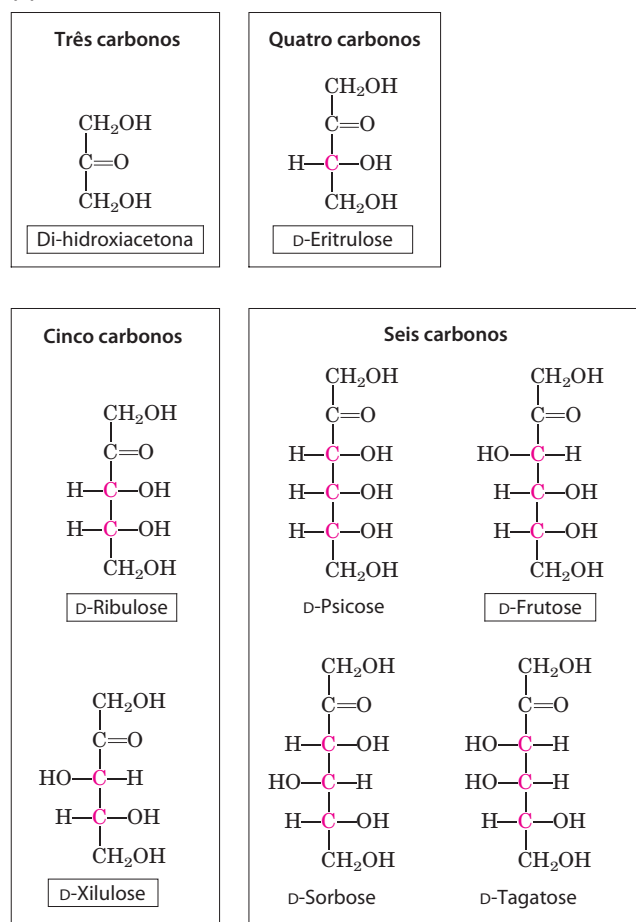



**FIGURA 7-3 Aldoses e cetoses.** As séries de **(a)** D-aldoses e **(b)** D-cetoses têm de três a seis átomos de carbono, mostradas como fórmulas de projeção. Os átomos de carbono em vermelho são centros quirais. Em todos estes isômeros D, o carbono quiral *mais distante do carbono do carbonil* apresenta a mesma configuração do carbono quiral do D-gliceraldeído. Os açúcares com os nomes dentro de retângulos são os mais comuns na natureza; você os encontrará novamente neste capítulo e em capítulos posteriores.

ções estereoisoméricas, denominadas $\alpha$ e $\beta$. Por exemplo, a D-glicose ocorre em solução na forma de hemiacetal intramolecular no qual o grupo hidroxila livre do C-5 reagiu com o C-1 do aldeído, gerando o carbono assimétrico e produzindo dois possíveis estereoisômeros, designados $\alpha$ e $\beta$ (**Figura 7-6**). As formas isoméricas de monossacarídeos que diferem apenas na configuração do átomo de carbono hemiacetal ou hemicetal são chamadas de **anômeros**, e o átomo de carbono da carbonila é chamado de **carbono anomérico**.

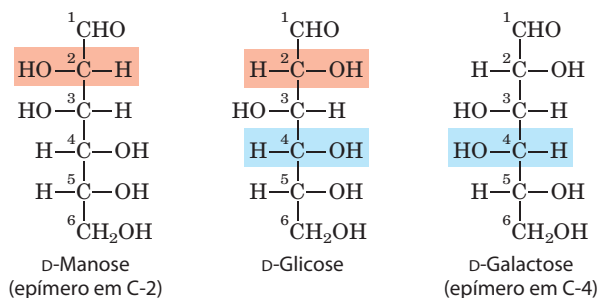



**FIGURA 7-4 Epímeros.** D-Glicose e dois de seus epímeros são mostrados como fórmulas de projeção. Cada epímero difere da D-glicose na configuração de um centro quiral (sombreado em cor salmão ou azul).

Aldeído Álcool Hemiacetal Acetal

Cetona Álcool Hemicetal Cetal

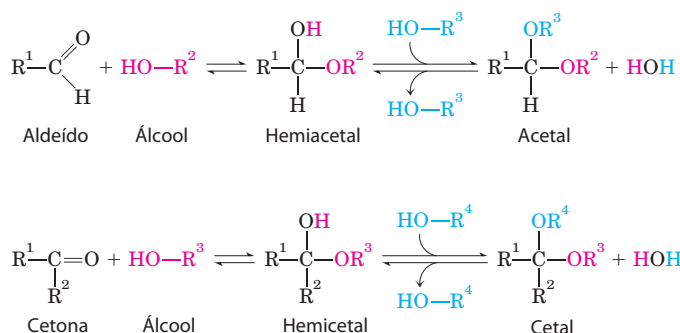



**FIGURA 7-5 Formação de hemiacetais e hemicetais.** Um aldeído ou uma cetona podem reagir com um álcool em uma razão de 1:1 para gerar um hemiacetal ou um hemicetal, respectivamente, criando um novo centro quiral no carbono da carbonila. A substituição de uma segunda molécula de álcool produz um acetal ou um cetal. Quando o segundo álcool é parte de outra molécula de açúcar, a ligação produzida é uma ligação glicosídica (p. 252).

D-Glicose

α-D-Glicopiranose β-D-Glicopiranose

**FIGURA 7-6 Formação das duas formas cíclicas da D-glicose.** A reação entre o grupo aldeído em C-1 e o grupo hidroxila em C-5 forma uma ligação hemiacetal, produzindo um dos dois estereoisômeros, os anômeros $\alpha$ e $\beta$, que diferem apenas na estereoquímica do carbono hemiacetal. Esta reação é reversível. A interconversão dos anômeros $\alpha$ e $\beta$ é chamada de mutarrotação.

Os compostos com anéis de seis membros são chamados de **piranoses**, pois se assemelham ao composto em anel de seis membros pirano (**Figura 7-7**). Os nomes sistemáticos para as duas formas em anel da D-glicose são $\alpha$-D-glicopiranose e $\beta$-D-glicopiranose. As ceto-hexoses (como a frutose) também ocorrem como compostos cíclicos com formas anoméricas $\alpha$ e $\beta$. Nesses compostos, o grupo da hidroxila em C-5 (ou C-6) reage com o grupo da cetona em C-2, formando um anel **furanose** (ou piranose), contendo uma ligação hemicetal (Figura 7-5). A D-frutose prontamente forma o anel furanose (Figura 7-7); o anômero mais comum desse açúcar, em formas combinadas ou em derivados, é a $\beta$-D-frutofuranose.

As estruturas cíclicas dos açúcares são representadas mais corretamente pelas **fórmulas em perspectiva de Haworth** do que pelas projeções de Fisher comumente utilizadas para as estruturas de açúcares lineares. Nas projeções de Haworth, o anel de seis membros é inclinado para deixar seu plano quase perpendicular ao plano do papel, com as ligações mais próximas do leitor representadas por linhas mais grossas do que aquelas representando as ligações mais distantes, como na Figura 7-7.

**CONVENÇÃO-CHAVE:** Para converter uma fórmula de projeção de Fisher de qualquer D-hexose linear em uma fórmula em perspectiva de Haworth mostrando a estrutura cíclica da molécula, desenhe o anel de seis membros (cinco carbonos e um oxigênio, na direita superior), numere os átomos no sentido horário começando com o carbono anomérico, e, então, coloque os grupos hidroxila. Se um grupo hidroxila estiver à direita na projeção de Fisher, ele é colocado apontando para baixo (ou seja, abaixo do plano do anel) na perspectiva de Haworth; se ele estiver à esquerda na projeção de Fisher, é colocado apontando para cima (ou seja, acima do plano) na perspectiva de Haworth. O grupo —$CH_2OH$ terminal projeta-se para cima no enantiômero D-, e para baixo no enantiômero L-. A hidroxila no carbono anomérico pode apontar para cima ou para baixo. Quando a hidroxila anomérica de uma D-hexose estiver no mesmo lado do anel que o C-6, a estrutura é, por definição, $\beta$; quando estiver do lado oposto do C-6, a estrutura é $\alpha$. ■

D-Glicose
Projeção de Fisher

α-D-Glicopiranose
Perspectiva de Haworth

**PROBLEMA RESOLVIDO 7-1 Conversão de projeções de Fisher a fórmulas em perspectiva de Haworth**

Desenhe as fórmulas em perspectiva de Haworth para D-manose e D-galactose.

D-Mannose D-Galactose

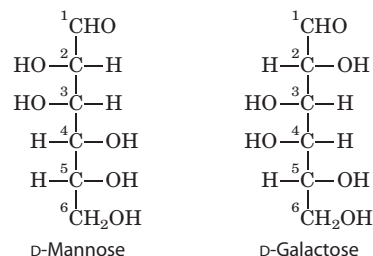
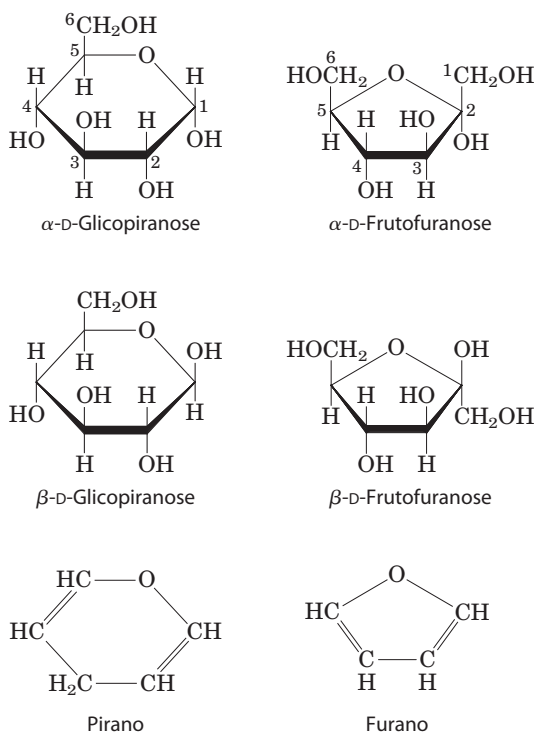



**FIGURA 7-7** **Piranoses e furanoses.** As formas piranose da D-glicose e as formas furanose da D-frutose estão mostradas aqui como fórmulas em perspectiva de Haworth. Os limites do anel mais próximos ao leitor são representados por linhas mais grossas. Os grupos hidroxila abaixo do plano do anel nestas perspectivas de Haworth apareceriam à direita em uma projeção de Fischer (compare com a Figura 7-6). Pirano e furano estão mostrados para comparações.

**Solução:** As piranoses são anéis de seis membros, então comece com estruturas de Haworth de seis membros com o átomo de oxigênio no topo à direita. Numere os átomos de carbono no sentido horário, começando com o carbono da aldose. Para a manose, coloque os grupos hidroxila nos C-2, C-3 e C-4 para cima, para cima e para baixo do anel, respectivamente (pois na projeção de Fisher elas estão no lado esquerdo, esquerdo e direito da estrutura da manose). Para a D-galactose, os grupos hidroxila estão orientados para baixo, para cima e para cima em C-2, C-3 e C-4, respectivamente. A hidroxila em C-1 pode estar para cima ou para baixo; existem duas configurações possíveis, $\alpha$ e $\beta$, para este carbono.

**PROBLEMA RESOLVIDO 7-2** **Desenhando fórmulas em perspectiva de Haworth para isômeros de açúcar**

Desenhe as fórmulas em perspectiva de Haworth para $\alpha$-D--manose e $\beta$-L-galactose.

**Solução:** A fórmula em perspectiva de Haworth para a D-manose do Problema Resolvido 7-1 pode ter o grupo hidroxila em C-1 apontando para cima ou para baixo. De acordo com a convenção-chave, para a forma $\alpha$, a hidroxila em C-1 aponta para baixo quando C-6 está para cima, como é o caso na D-manose.

Para a $\beta$-L-galactose, use a representação de Fisher da D-galactose (ver Problema Resolvido 7-1) para desenhar a correta representação de Fisher da L-galactose, que é a sua imagem especular: os grupos hidroxila em C-2, C-3, C-4 e C-5 estão à esquerda, direita, direita e esquerda, respectivamente. Agora, desenhe a perspectiva de Haworth, um anel de seis membros no qual os grupos —OH em C-2, C-3 e C-4 estão orientados para cima, para baixo e para baixo, respectivamente, pois na representação de Fisher eles estão à esquerda, direita e direita. Como essa é a forma $\beta$, o —OH no carbono anomérico aponta para baixo (mesmo lado que C-5).

Os anômeros $\alpha$ e $\beta$ da D-glicose se interconvertem em solução aquosa por um processo chamado de **mutarrotação**, no qual uma forma em anel (por exemplo, o anômero $\alpha$) se abre brevemente na forma linear, e então se fecha novamente produzindo o anômero $\beta$ (Figura 7-6). Portanto, uma solução de $\alpha$-D-glicose e uma solução de $\beta$-D-glicose formarão, ao final, misturas de equilíbrio idênticas, as quais têm propriedades ópticas idênticas. Essa mistura consiste em aproximadamente um terço de $\alpha$-D-glicose, dois terços de $\beta$-D-glicose e quantidades muito pequenas das formas linear e em anel de cinco membros (glicofuranose).

Fórmulas em perspectiva de Haworth, como aquelas da Figura 7-7, são comumente utilizadas para mostrar a estereoquímica das formas em anel de monossacarídeos. Porém, o anel de seis membros piranose não é planar, como a perspectiva de Haworth sugere, mas tende a assumir uma de duas conformações em "cadeira" (**Figura 7-8**). Relembre do Capítulo 1 (p. 18-19), em que duas *conformações* de uma molécula são interconversíveis sem quebra de ligações covalentes, enquanto duas *configurações* podem ser interconvertidas somente com a quebra de uma ligação covalente. Para interconverter as configurações $\alpha$ e $\beta$, a ligação envolvendo o átomo de oxigênio do anel precisa ser rompida, mas a interconversão de duas formas em cadeira (que são *confôrmeros*) não requer quebra de ligações e não altera as configurações de nenhum dos carbonos do anel. As estruturas tridimensionais específicas de unidades de monossacarídeos são importantes para a determinação das propriedades biológicas e das funções de alguns polissacarídeos, como será visto.

## Os organismos contêm diversos derivados de hexose

Além das hexoses simples, como glicose, galactose e manose, existe uma variedade de derivados de açúcar nos quais o grupo hidroxila do composto parental é substituído por outro grupamento ou um átomo de carbono é oxidado a um grupo carboxil (**Figura 7-9**). Em glicosamina, galactosamina e manosamina, a hidroxila no C-2 do composto parental está substituído por um grupo amino. Normalmente, o grupo amino está condensado ao ácido acético, como na *N*-acetilglicosamina. Esse derivado da glicosamina compõe muitos polímeros estruturais, incluindo aqueles da parede celular de bactérias. A substituição de um hidrogênio por um grupo hidroxila no C-6 da L-galactose ou L-manose origina L-fucose ou L-ramnose, respectivamente. A L-fucose é encontrada nos oligossacarídeos complexos que compõem glicoproteínas e glicolipídeos; a L-ramnose é encontrada em polissacarídeos vegetais.

Eixo

Eixo

Duas possíveis formas em cadeira da β-D-glicopiranose
**(a)**

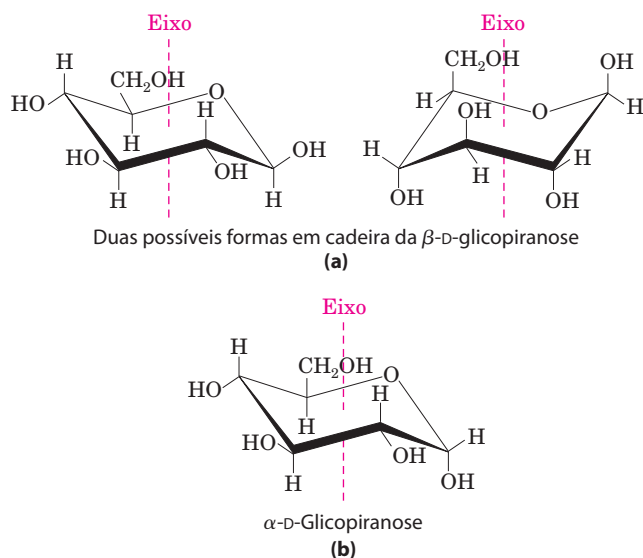
Eixo

α-D-Glicopiranose
**(b)**

**FIGURA 7-8 Fórmulas conformacionais de piranoses. (a)** Duas formas em cadeira do anel piranose da β-glicopiranose. Dois *confôrmeros* como estes não são prontamente interconversíveis; um aporte de cerca de 46 kJ de energia por mol de açúcar é necessário para forçar a interconversão das formas em cadeira. Outra conformação, o "barco" (não mostrada), é vista apenas em derivados com substituintes muito grandes. **(b)** A conformação em cadeira preferencial da α-D-glicopiranose.

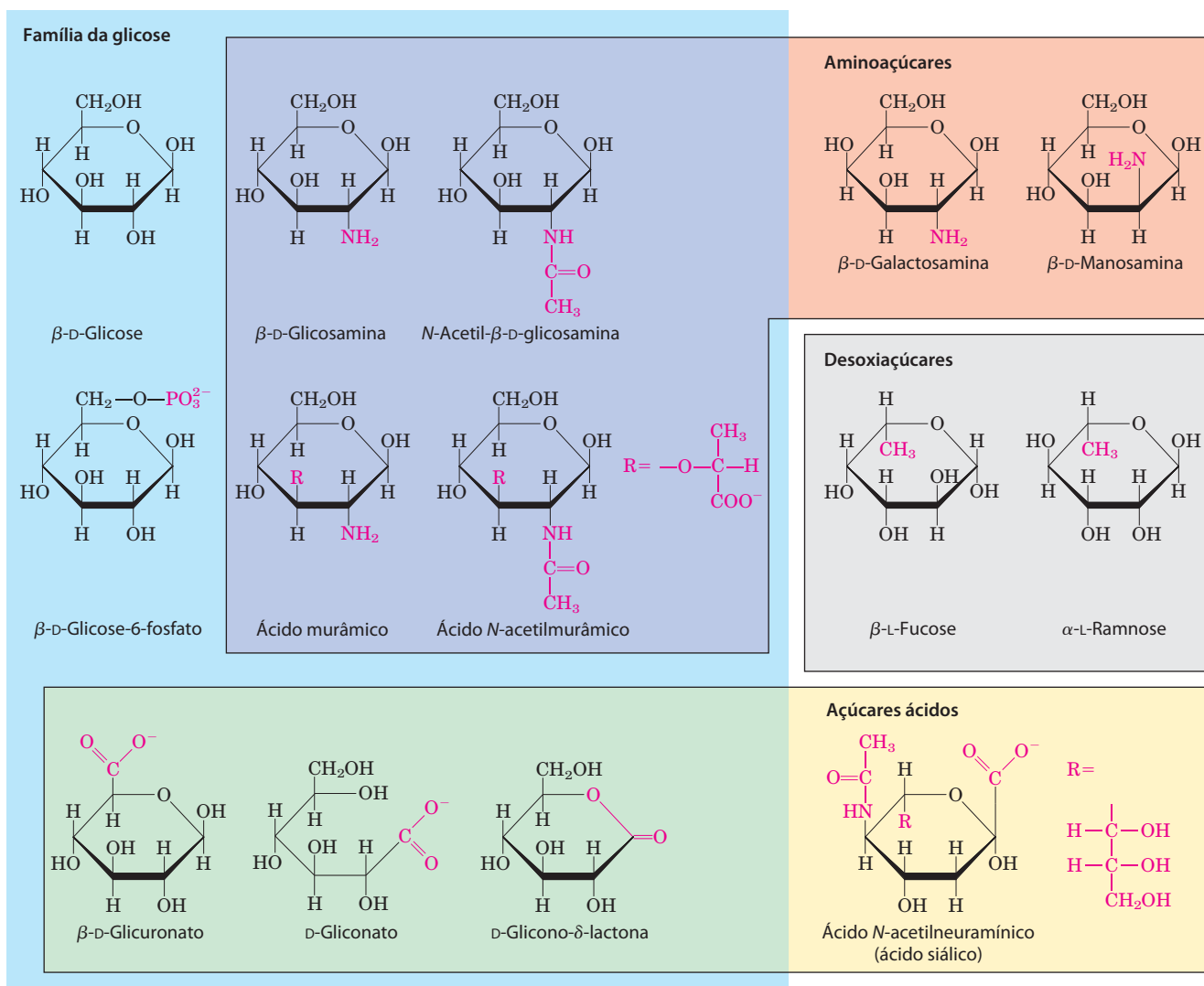



**FIGURA 7-9 Alguns derivados de hexose importantes na biologia.** Nos aminoaçúcares, um grupo $-NH_2$ substitui um dos grupos $-OH$ na hexose parental. A substituição de $-H$ por $-OH$ origina um desoxiaçúcar; observe que os desoxiaçúcares mostrados aqui ocorrem como isômeros L na natureza. Os açúcares ácidos contêm um grupo carboxilato, o que confere carga negativa em pH neutro. D-Glicono-δ-lactona é o resultado da formação de uma ligação éster entre o grupo carboxilato em C-1 e o grupo hidroxila em C-5 (também conhecido como o carbono δ do D-gliconato).

A oxidação do carbono do carbonil (aldeído) a carboxil na glicose produz ácido glicônico, utilizado na medicina como um contraíon inócuo para a administração de fármacos positivamente carregados (tais como o quinino) ou íons (tais como o $Ca^{2+}$). Outras aldoses originarão outros **ácidos aldônicos**. A oxidação do carbono na outra extremidade da cadeia carbônica – C-6 da glicose, galactose ou manose – forma o **ácido urônico** correspondente: ácidos glicurônico, galacturônico ou manurônico. Tanto os ácidos aldônicos como os urônicos formam ésteres intramoleculares estáveis chamados de lactonas (Figura 7-9, embaixo à esquerda). Os ácidos siálicos constituem uma família de açúcares com o mesmo esqueleto de nove carbonos. Um deles, o ácido *N*-acetilneuramínico (frequentemente chamado apenas de "ácido siálico"), é um derivado da *N*-acetilmanosamina, que ocorre em muitas glicoproteínas e glicolipídeos animais. Os grupos ácidos carboxílicos dos derivados de açúcar ácidos estão ionizados em pH 7, e esses compostos são, portanto, corretamente nomeados como carboxilatos – glicuronato, galacturonato, e assim por diante.

Muito frequentemente durante a síntese e o metabolismo de carboidratos, os intermediários não são os próprios açúcares, mas os seus derivados fosforilados. A condensação do ácido fosfórico com um dos grupos hidroxila de um açúcar forma um éster de fosfato, como na glicose-6-fosfato (Figura 7-9), o primeiro metabólito da rota por meio da qual a maioria dos organismos oxida a glicose para energia. Os açúcares fosforilados são relativamente estáveis em pH neutro e têm carga negativa. Um dos efeitos da fosforilação intracelular de açúcares é o confinamento do açúcar dentro da célula; a maioria das células não tem transportadores para açúcares fosforilados na membrana plasmática. A fos-

## QUADRO 7-1  MEDICINA Dosagem de glicose sanguínea no diagnóstico e no tratamento do diabetes

A glicose é o principal combustível para o cérebro. Quando a quantidade de glicose que chega até o cérebro é muito baixa, as consequências podem ser desastrosas: letargia, coma, dano cerebral permanente e morte (ver Figura 23-24). Com a evolução, os animais desenvolveram mecanismos hormonais complexos para garantir que a concentração de glicose no sangue permaneça alta o suficiente (aproximadamente 5 mM) para satisfazer as necessidades cerebrais, mas não alta demais, já que níveis elevados de glicose no sangue também podem ter consequências fisiológicas sérias.

Os indivíduos com diabetes melito dependente de insulina não produzem insulina suficiente, o hormônio que normalmente atua para a redução da concentração de glicose no sangue, e, se o diabetes não for tratado, os níveis de glicose sanguínea nesses indivíduos podem elevar-se, ficando algumas vezes maiores do que o normal. Acredita-se que esses altos níveis de glicose sejam pelo menos uma das causas das sérias consequências de longo prazo no diabetes não tratado – insuficiência renal, doenças cardiovasculares, cegueira e cicatrização debilitada –, de modo que um dos objetivos da terapia é prover exatamente a quantidade de insulina suficiente (por injeção) para manter os níveis de glicose próximos do normal. Para manter o balanço correto entre exercício, dieta e insulina para cada indivíduo, a concentração de glicose sanguínea deve ser dosada algumas vezes ao dia, e a quantidade de insulina injetada deve ser ajustada de modo apropriado.

As concentrações de glicose no sangue e na urina podem ser determinadas por meio de um ensaio simples para açúcares redutores, como a reação de Fehling, que por muitos anos foi o teste diagnóstico padrão para diabetes. Dosagens modernas precisam de apenas uma gota de sangue, que é adicionada a uma fita de teste contendo a enzima glicose-oxidase, que catalisa a seguinte reação:

$$\text{D-Glicose} + O_2 \xrightarrow{\text{glicose-oxidase}} \text{D-Glicono-}\delta\text{-lactona} + H_2O_2$$

Uma segunda enzima, uma peroxidase, catalisa a reação do $H_2O_2$ com um composto incolor gerando um produto colorido, quantificado com um fotômetro simples que mostra a concentração de glicose no sangue.

Como os níveis de glicose sanguínea variam com os períodos de refeição e exercício, essas dosagens em momentos específicos não refletem a glicose sanguínea *média* ao longo de horas ou dias, de modo que elevações perigosas podem passar despercebidas. A concentração de média glicose pode ser estimada pelo seu efeito na hemoglobina, a proteína carreadora de oxigênio dos eritrócitos (p. 163). Transportadores na membrana dos eritrócitos equilibram a concentração de glicose intracelular e plasmática, de modo que a hemoglobina está constantemente exposta à concentração de glicose presente no sangue, qualquer que seja essa concentração. Uma reação não enzimática ocorre entre a glicose e os grupos amino primários da hemoglobina (tanto a Val aminoterminal quanto os grupos amino $\varepsilon$ dos resíduos de Lys; Figura Q-1). A velocidade desse processo é proporcional à concentração de glicose; por isso, essa reação pode ser usada como base para a estimativa do nível médio de glicose sanguínea ao longo de semanas. A quantidade de hemoglobina glicada (HbG) circulante em qualquer momento reflete a concentração de glicose sanguínea média durante o "período de vida" do eritrócito (cerca de 120 dias), embora a concentração das últimas duas semanas seja a mais importante na determinação do nível de HbG.

A extensão de **glicação da hemoglobina** (chamada assim para distingui-la da glicosilação, a transferência *enzimática* de glicose a uma proteína) é medida clinicamente pela extração da hemoglobina de uma pequena amostra de sangue seguida pela separação eletroforética de HbG e hemoglobina não modificada, aproveitando a diferença de carga resultante da modificação do(s) grupo(s) amino. Valores de HbG normais são cerca de 5% da hemoglobina total (correspondendo à glicose san-

forilação também ativa açúcares para subsequente transformação química. Alguns derivados de açúcares fosforilados importantes são componentes dos nucleotídeos (discutido no próximo capítulo).

## Os monossacarídeos são agentes redutores

Os monossacarídeos podem ser oxidados por agentes oxidantes relativamente suaves, como o íon cúprico ($Cu^{2+}$). O carbono do carbonil é oxidado a um grupo carboxil. A glicose e outros açúcares capazes de reduzir o íon cúprico são chamados de **açúcares redutores**. O íon cúprico oxida a glicose e certos outros açúcares a uma complexa mistura de ácidos carboxílicos. Essa é a base da reação de Fehling, teste semiquantitativo para a presença de açúcar redutor, que por muitos anos foi utilizado para detectar e dosar níveis elevados de glicose em pessoas com diabetes melito. Hoje, utilizam-se métodos mais sensíveis, que envolvem uma enzima imobilizada em uma tira de teste e requerem apenas uma única gota de sangue (Quadro 7-1). ■

## Os dissacarídeos contêm uma ligação glicosídica

Os dissacarídeos (como maltose, lactose e sacarose) consistem em dois monossacarídeos unidos covalentemente por uma **ligação *O*-glicosídica**, a qual é formada quando um grupo hidroxila de uma molécula de açúcar, normalmente cíclica, reage com o carbono anomérico de outro (**Figura 7-10**). Essa reação representa a formação de um acetal a partir de um hemiacetal (como a glicopiranose) e um álcool (um grupo hidroxila da segunda molécula de açúcar) (Figura 7-5), e o composto resultante é chamado de glicosídeo.

guínea igual a 120 mg/100 mL). Em pessoas com diabetes não tratado, entretanto, esse valor pode ser tão alto quanto 13%, indicando um nível de glicose sanguínea médio de cerca de 300 mg/100 mL, ou seja, perigosamente alto. Um dos critérios para o sucesso em um programa individual de terapia com insulina (quando começar, frequência e quantidade de insulina injetada) é a manutenção dos valores de HbG em cerca de 7%.

Na reação de glicação da hemoglobina, a primeira etapa (formação de uma base de Schiff) é seguida por uma série de rearranjos, oxidações e desidratações da porção de carboidrato, produzindo uma mistura heterogênea de AGE (produtos finais de glicação avançada; do inglês, *advanced glycation end products*). Esses produtos podem deixar o eritrócito e formar ligações cruzadas covalentes entre as proteínas, interferindo com a função normal delas (Figura Q-1). O acúmulo de concentrações relativamente altas de AGE em pessoas com diabetes pode causar, pela ligação cruzada de proteínas críticas, problemas aos rins, à retina e ao sistema cardiovascular, sintomas que caracterizam a doença. Esse processo patogênico é um potencial alvo para a ação de fármacos.

Glicose + $H_2N{-}R$ Hemoglobina
❶ ↓
Base de Schiff
❷a ↓
❷b ↓
Cetoamina
❸ ↓
Hemoglobina glicada (HbG)
❹ ↓
AGEs
❺ ↓
Ligação cruzada de proteínas
↓? ↓? ↓?
Dano aos rins, à retina, ao sistema cardiovascular

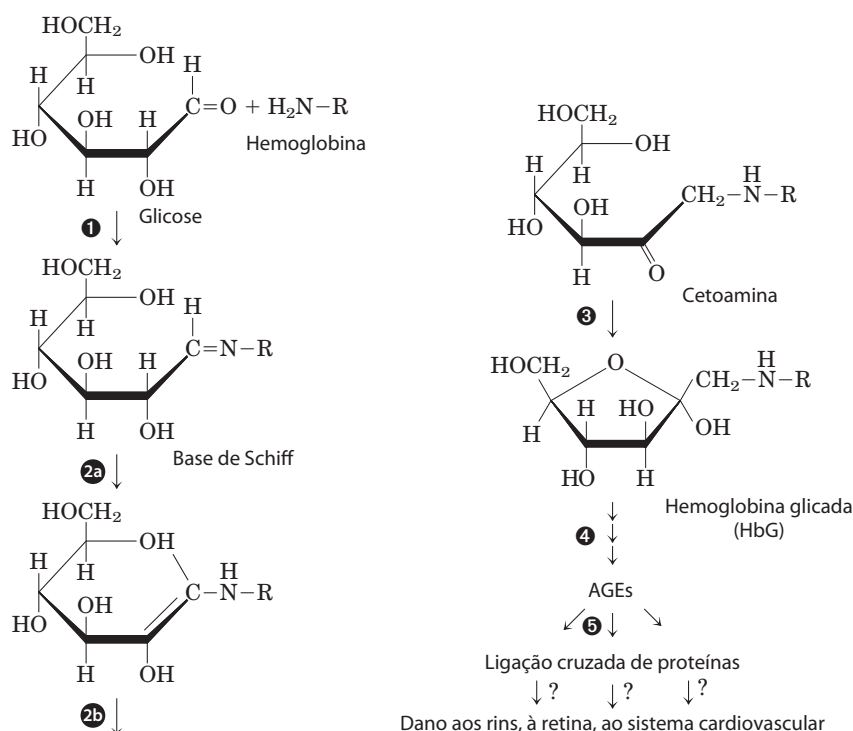



**FIGURA Q-1** A reação não enzimática da glicose com um grupo amino primário na hemoglobina começa com ❶ a formação de uma base de Schiff, a qual ❷ sofre um rearranjo para gerar um produto estável; ❸ esta cetoamina depois se converte em sua forma cíclica, originando HbG. ❹ Reações seguintes geram produtos finais de glicação avançada (AGE), como $\varepsilon$-*N*-carboximetil-lisina e metilglioxal, compostos que ❺ danificam outras proteínas ao ligá-las de modo cruzado, causando alterações patológicas.

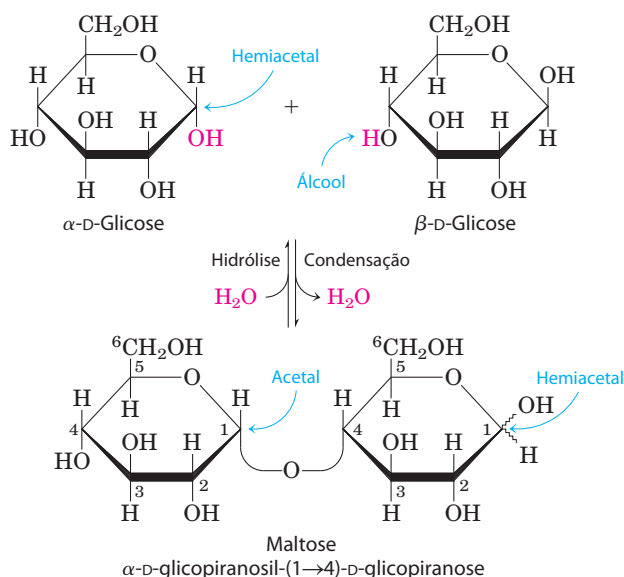



**FIGURA 7-10 Formação da maltose.** Um dissacarídeo é formado a partir de dois monossacarídeos (aqui, duas moléculas de D-glicose) quando um —OH (álcool) de uma molécula (à direita) se condensa com o hemiacetal intramolecular da outra (à esquerda), com a eliminação de $H_2O$ e a formação de uma ligação glicosídica. O inverso desta reação é uma hidrólise – ataque da ligação glicosídica pela água. A molécula de maltose, mostrada aqui, conserva um hemiacetal redutor no C-1 não envolvido na ligação glicosídica. Como a mutarrotação interconverte as formas $\alpha$ e $\beta$ do hemiacetal, as ligações nesta posição algumas vezes são representadas por linhas onduladas, conforme mostrado aqui, para indicar que a estrutura pode ser tanto $\alpha$ quanto $\beta$.

Ligações glicosídicas são prontamente hidrolisadas por ácido, mas resistem à clivagem por base. Assim, os dissacarídeos podem ser hidrolisados para originar seus componentes monossacarídicos livres por fervura em ácido diluído. **Ligações *N*-glicosídicas** unem o carbono anomérico de um açúcar a um átomo de nitrogênio em glicoproteínas (ver Figura 7-30) e nucleotídeos (ver Figura 8-1).

A oxidação de um açúcar pelo íon cúprico (a reação que define um açúcar redutor) ocorre apenas com a forma linear, a qual existe em equilíbrio com a(s) forma(s) cíclica(s). Quando o carbono anomérico está envolvido em uma ligação glicosídica (ou seja, quando o composto for um acetal ou cetal completo; ver Figura 7-5), a fácil interconversão entre as formas lineares e cíclicas mostrada na Figura 7-6 é impedida. Como o carbono do carbonil pode ser oxidado somente quando o açúcar estiver em sua forma linear, a formação de uma ligação glicosídica gera um açúcar não redutor. Na descrição de dissacarídeos ou polissacarídeos, a extremidade de uma cadeia com um carbono anomérico livre (não envolvido em ligação glicosídica) normalmente é chamada de **extremidade redutora**.

O dissacarídeo maltose (Figura 7-10) contém dois resíduos de D-glicose unidos por uma ligação glicosídica entre o C-1 (o carbono anomérico) de um resíduo de glicose e o C-4 do outro. Como o dissacarídeo conserva um carbono anomérico livre (o C-1 do resíduo de glicose à direita na Figura 7-10), a maltose é um açúcar redutor. A configuração do átomo de carbono anomérico na ligação glicosídica é $\alpha$. O resíduo de glicose com o carbono anomérico livre pode existir nas formas piranose $\alpha$ ou $\beta$.

**CONVENÇÃO-CHAVE:** Para nomear dissacarídeos redutores como a maltose de forma não ambígua e, especialmente, para nomear oligossacarídeos mais complexos, algumas regras devem ser seguidas. Por convenção, o nome descreve o composto escrito com a extremidade não redutora à esquerda, e é possível "construir" o nome na seguinte ordem: (1) Dar a configuração ($\alpha$ ou $\beta$) do carbono anomérico que une a primeira unidade de monossacarídeo (à esquerda) com a segunda. (2) Identificar o resíduo não redutor; para distinguir entre estruturas em anel de cinco e seis membros, inserir "furano" ou "pirano" no nome. (3) Indicar entre parênteses os dois átomos de carbono unidos pela ligação glicosídica, usando uma seta para conectar os dois números; por exemplo, (1→4) mostra que o C-1 do resíduo de açúcar nomeado primeiramente está unido ao C-4 do segundo. (4) Identificar o segundo resíduo. Se houver um terceiro resíduo, descrever a segunda ligação glicosídica seguindo as mesmas convenções. (Para encurtar a descrição de polissacarídeos complexos, abreviações de três letras ou símbolos coloridos para os monossacarídeos frequentemente são utilizados, como apresentado na Tabela 7-1.) Seguindo essa convenção para a nomenclatura de oligossacarídeos, a maltose é $\alpha$-D-glicopiranosil-(1→4)-D-glicopiranose. Como em sua maioria os açúcares encontrados neste livro são os enantiômeros D e a forma piranose das hexoses é predominante, geralmente se utiliza uma versão abreviada do nome formal desses compostos, dando a configuração do carbono anomérico e nomeando os carbonos unidos pela ligação glicosídica. Nesta nomenclatura abreviada, a maltose é Glc($\alpha$1→4)Glc. ■

O dissacarídeo lactose (**Figura 7-11**), que produz D-galactose e D-glicose quando hidrolisado, ocorre naturalmente no leite. O carbono anomérico do resíduo de glicose está disponível para oxidação e, portanto, a lactose é um dissacarídeo redutor. Seu nome abreviado é Gal($\beta$1→4)Glc. A sacarose (açúcar de mesa) é um dissacarídeo de glico-

**TABELA 7-1** Símbolos e abreviações para monossacarídeos comuns e alguns de seus derivados

| Monossacarídeo | Símbolo | Abreviação | Derivado | Símbolo | Abreviação |
|---|---|---|---|---|---|
| Abequose | | Abe | Ácido glicurônico | ◆ | GLcA |
| Arabinose | | Ara | Galactosamina | ◩ | GalN |
| Frutose | | Fru | Glicosamina | ◪ | GlcN |
| Fucose | ▲ | Fuc | *N*-Acetilgalactosamina | ■ | GalNAc |
| Galactose | ● | Gal | *N*-Acetilglicosamina | ■ | GlcNAc |
| Glicose | ● | Glc | Ácido idurônico | ◇ | IdoA |
| Manose | ● | Man | Ácido murâmico | | Mur |
| Ramnose | | Ram | Ácido *N*-acetilmurâmico | | Mur2Ac |
| Ribose | | Rib | Ácido *N*-acetilneuramínico (um ácido siálico) | ◆ | Neu5Ac |
| Xilose | ★ | Xil | | | |

**Nota:** Na convenção comumente utilizada, as hexoses são representadas como círculos, *N*-acetil-hexosaminas são quadrados e hexosaminas são quadrados divididos na diagonal. Todos os açúcares com a configuração "glico" são azuis, aqueles com a configuração "galacto" são amarelos e os açúcares "mano" são verdes. Outros substituintes podem ser adicionados conforme a necessidade: sulfato (S), fosfato (P), *O*-acetil (OAc) ou *O*-metil (OMe).

Lactose (forma $\beta$)
$\beta$-D-galactopiranosil-(1→4)-$\beta$-D-glicopiranose
Gal($\beta$1→4)Glc

Sacarose
$\beta$-D-frutofuranosil $\alpha$-D-glicopiranosídeo
Fru(2$\beta$↔$\alpha$1)Glc ≡ Glc($\alpha$1↔2$\beta$)Fru

Trealose
$\alpha$-D-glicopiranosil $\alpha$-D-glicopiranosídeo
Glc($\alpha$1↔1$\alpha$)Glc

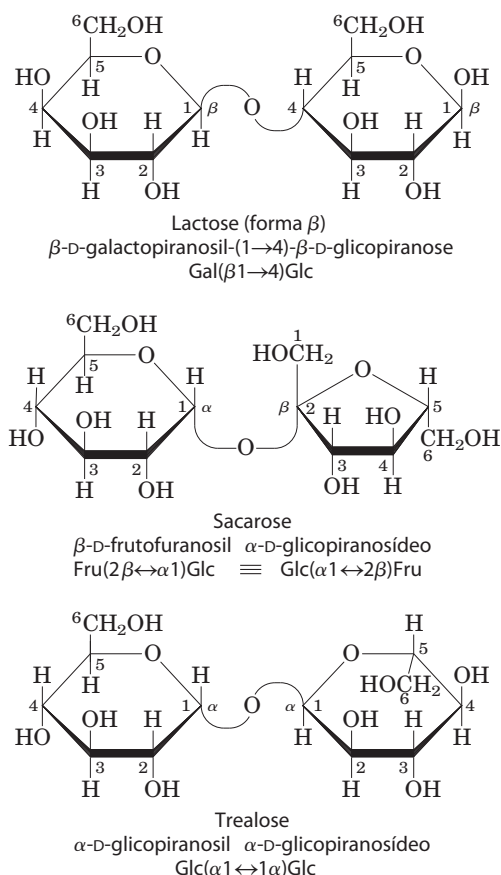



**FIGURA 7-11 Dois dissacarídeos comuns.** Como a maltose da Figura 7-10, estes dissacarídeos estão representados como perspectivas de Haworth. O nome comum, o nome sistemático completo e a abreviação estão mostrados para cada dissacarídeo. A nomenclatura formal da sacarose nomeia a glicose como o glicosídeo parental, embora a sacarose seja normalmente representada como mostrado, com a glicose à esquerda. As duas nomenclaturas abreviadas mostradas para a sacarose são equivalentes (≡).

se e frutose, sintetizado por plantas, mas não por animais. Ao contrário de maltose e lactose, a sacarose não contém um átomo de carbono anomérico livre; os carbonos anoméricos de ambas as unidades monossacarídicas estão envolvidos na ligação glicosídica (Figura 7-11). A sacarose é, assim, um açúcar não redutor, e sua estabilidade frente à oxidação a torna uma molécula adequada para o armazenamento e o transporte de energia em plantas. Na nomenclatura abreviada, uma seta com duas pontas conecta os símbolos que especificam os carbonos anoméricos e suas configurações. Por exemplo, o nome abreviado da sacarose é ou Glc($\alpha$1↔2$\beta$)Fru ou Fru($\beta$2↔1$\alpha$)Glc. A sacarose é o principal produto intermediário da fotossíntese; em muitas plantas, ela é a principal maneira de transportar o açúcar das folhas para as outras partes do corpo da planta. A trealose, Glc($\alpha$1↔1$\alpha$)Glc (Figura 7-11) – dissacarídeo de D-glicose que, como a sacarose, é um açúcar não redutor –, é um constituinte importante do fluido circulante (hemolinfa) de insetos, servindo como composto de armazenamento de energia. A lactose dá ao leite o seu sabor adocicado, e a sacarose, obviamente, é o açúcar de mesa. A trealose também é comercialmente utilizada como adoçante. O Quadro 7-2 explica a detecção do sabor doce pelos humanos e o modo de ação dos adoçantes artificiais, como o aspartame.

### RESUMO 7.1 Monossacarídeos e dissacarídeos

- Os açúcares (também chamados de sacarídeos) são compostos que contêm um grupo aldeído ou cetona e dois ou mais grupos hidroxila.
- Os monossacarídeos geralmente contêm alguns carbonos quirais e, assim, existem em várias formas estereoquímicas, as quais podem ser representadas no papel como projeções de Fischer. Epímeros são açúcares que diferem na configuração de apenas um átomo de carbono.
- Os monossacarídeos comumente formam hemiacetais ou hemicetais internos, nos quais o grupo aldeído ou cetona se une a um grupo hidroxila da mesma molécula, criando uma estrutura cíclica; isso pode ser representado como uma fórmula em perspectiva de Haworth. O átomo de carbono originalmente localizado no grupo aldeído ou cetona (o carbono anomérico) pode assumir uma de duas configurações, $\alpha$ e $\beta$, interconversíveis por mutarrotação. Na forma linear do monossacarídeo, em equilíbrio com as formas cíclicas, o carbono anomérico é facilmente oxidável, tornando o composto um açúcar redutor.
- Um grupo hidroxila de um monossacarídeo pode ser adicionado ao carbono anomérico de um segundo monossacarídeo, formando um acetal chamado de glicosídeo. Nesse dissacarídeo, a ligação glicosídica protege o carbono anomérico de oxidação, tornando-o um açúcar não redutor.
- Oligossacarídeos são polímeros curtos, com alguns monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas. Em uma das extremidades da cadeia, a extremidade redutora, está uma unidade de monossacarídeo com seu carbono anomérico não envolvido em uma ligação glicosídica.
- A nomenclatura comum para di ou oligossacarídeos especifica a ordem das unidades de monossacarídeos, a configuração de cada carbono anomérico e os átomos de carbono participantes da(s) ligação(ões) glicosídica(s).

## 7.2 Polissacarídeos

A maioria dos carboidratos encontrados na natureza ocorre como polissacarídeos, polímeros de média a alta massa molecular ($M_r$ >20.000). Os polissacarídeos, também chamados de **glicanos**, diferem uns dos outros na identidade das unidades de monossacarídeos repetidas, no comprimento das cadeias, nos tipos de ligações unindo as unidades e no grau de ramificação. Os **homopolissacarídeos** contêm somente uma única espécie monomérica; os **heteropolissacarídeos** contêm dois ou mais tipos diferentes (**Figura 7-12**). Alguns homopolissacarídeos, como o amido e o glicogênio, servem como formas de armazenamento para monossacarídeos utilizados como combustíveis. Outros homopolissacarídeos, como a celulose e a quitina, atuam como elementos estruturais em paredes celulares de plantas e em exoesqueletos de animais. Os heteropolissacarídeos

## QUADRO 7-2 O açúcar é doce, assim como o são... outras coisas mais

O doce é um dos cinco sabores básicos que os humanos podem sentir (Figura Q-1); os outros são azedo, amargo, salgado e umami. O sabor doce é detectado por receptores proteicos presentes na membrana plasmática das células gustativas nas papilas gustativas da superfície da língua. Em humanos, dois genes bastante relacionados (*T1R2* e *T1R3*) codificam os receptores para o sabor doce (Figura Q-2). Quando uma molécula com uma estrutura compatível liga-se a esses receptores no domínio extracelular de uma célula gustativa, ela desencadeia uma série de eventos dentro da célula (incluindo a ativação de uma proteína ligadora de GTP; ver Figura 12-42) que levam à emissão de um sinal elétrico para o cérebro que é, então, interpretado como "doce". Durante a evolução, houve, provavelmente, a seleção para a capacidade de saborear os compostos presentes nos alimentos contendo nutrientes importantes, como os carboidratos, que são o principal combustível

**FIGURA Q-1** Um formidável estímulo para os receptores do sabor doce.

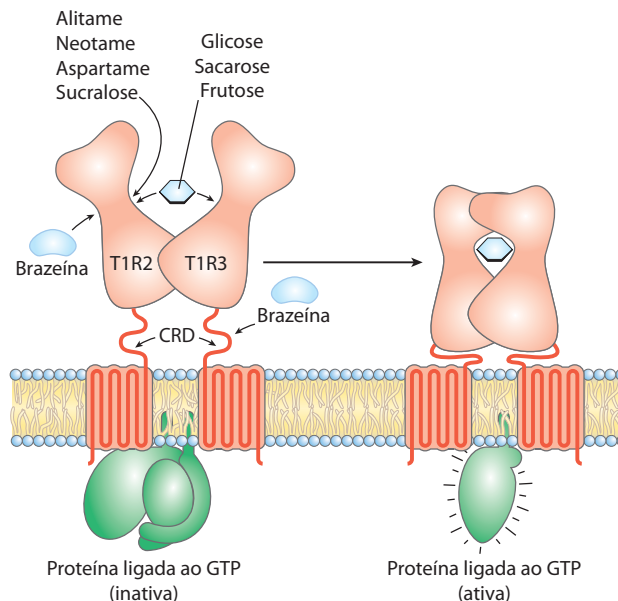



**FIGURA Q-2** O receptor para substâncias com sabor doce, com indicação de suas regiões de interação com vários compostos doces (setas curtas). Cada receptor tem um domínio extracelular, um domínio rico em cisteína (CRD), e um domínio de membrana com sete hélices transmembrana, característica comum em receptores de sinalização. Os adoçantes artificiais se ligam a apenas uma das duas subunidades do receptor; os açúcares naturais se ligam às duas. Consulte no Capítulo 1, Problema 14, as estruturas de muitos desses adoçantes artificiais.

fornecem suporte extracelular para organismos de todos os reinos. Por exemplo, a camada rígida do envelope celular bacteriano (o peptidoglicano) é parcialmente composta por um heteropolissacarídeo construído por duas unidades alternadas de monossacarídeo (ver Figura 20-30). Nos tecidos animais, o espaço extracelular é preenchido por alguns tipos de heteropolissacarídeos, os quais formam uma matriz que conecta células individuais e fornece proteção, forma e suporte para células, tecidos e órgãos.

Ao contrário das proteínas, os polissacarídeos geralmente não têm massas moleculares definidas. Essa diferença é uma consequência dos mecanismos de construção dos dois tipos de polímero. Como será visto no Capítulo 27, as proteínas são sintetizadas a partir de um molde (o RNA mensageiro), com sequência e comprimento definidos por enzimas que seguem exatamente esse molde. Para a síntese de polissacarídeos, não existe molde; em vez disso, o programa de síntese de polissacarídeos é intrínseco às enzimas que catalisam a polimerização das unidades monoméricas, e não há um ponto de parada específico no processo sintético; os produtos, portanto, variam em comprimento.

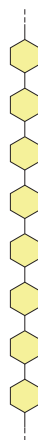



**FIGURA 7-12 Homo e heteropolissacarídeos.** Os polissacarídeos podem ser compostos por um, dois ou alguns monossacarídeos diferentes, em cadeias lineares ou ramificadas de vários comprimentos.

para a maioria dos organismos. A maioria dos açúcares simples, incluindo a sacarose, a glicose e a frutose, tem sabor doce, mas existem outras classes de compostos que também se ligam aos receptores do sabor doce: os aminoácidos glicina, alanina e serina são suavemente doces e inócuos; o nitrobenzeno e o etileno glicol têm um sabor doce forte, porém são tóxicos. (Consulte no Quadro 18-2 um notável mistério médico envolvendo o envenenamento por etilenoglicol.) Alguns produtos naturais são extraordinariamente doces: o esteviosídeo, derivado de açúcar isolado das folhas da planta estévia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), é algumas centenas de vezes mais doce do que o volume equivalente de sacarose (açúcar de mesa), e a pequena proteína (54 aminoácidos) brazeína, isolada dos frutos da trepadeira *Pentadiplandra brazzeana* Baillon, com ocorrência no Gabão e em Camarões, é 17.000 vezes mais doce do que a sacarose em comparação molar. Presume-se que o sabor doce desses frutos encoraje o seu consumo por animais, que, então, dispersam geograficamente as sementes estimulando o crescimento de novas plantas.

Existe um grande interesse no desenvolvimento de adoçantes artificiais para auxiliar na redução do peso – compostos que forneçam aos alimentos sabor doce sem adicionar as calorias encontradas nos açúcares. O adoçante artificial aspartame demonstra a importância da estereoquímica na biologia (Figura Q-3). De acordo com um modelo simples para a ligação ao receptor do sabor doce, a ligação envolve três sítios do receptor: $AH^+$, $B^-$ e X. O sítio $AH^+$ contém algum grupo (álcool ou amino) que pode formar uma ligação de hidrogênio com uma carga parcialmente negativa, como o oxigênio do carbonil, da molécula doce; o ácido carboxílico do aspartame contém um oxigênio deste tipo. O sítio $B^-$ contém um grupo com um oxigênio parcialmente negativo disponível para formar uma ligação de hidrogênio com algum átomo parcialmente positivo da molécula doce, tal como o grupo amino do aspartame. O sítio X é orientado perpendicularmente aos outros dois grupos e é capaz de interagir com uma região hidrofóbica da molécula doce, tal como o anel benzeno do aspartame.

Quando o pareamento (*match*) estiver correto, como na Figura Q-3 à esquerda, o receptor do sabor doce será estimulado e o sinal "doce" será conduzido ao cérebro. Quando o pareamento não estiver correto, como na Figura Q-3 à direita, o receptor do sabor doce não será estimulado; na verdade, neste caso, outro receptor (para o sabor amargo) será estimulado pelo estereoisômero "errado" do aspartame. Estereoisomerismo realmente importa!

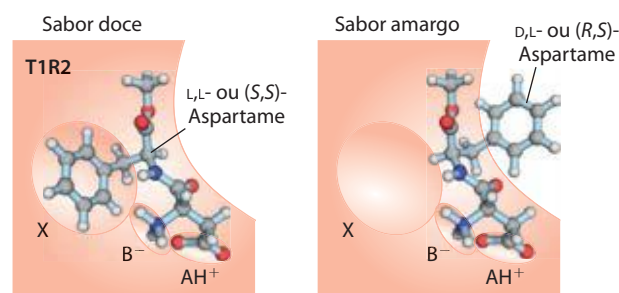



**FIGURA Q-3** A base estereoquímica para o sabor dos dois isômeros do aspartame.

## Alguns homopolissacarídeos são formas de estocagem de combustível

Os polissacarídeos de armazenamento mais importantes são o amido, em células vegetais, e o glicogênio, em células animais. Ambos ocorrem intracelularmente em grandes agrupamentos ou grânulos. As moléculas de amido e glicogênio são extremamente hidratadas, pois têm muitos grupos hidroxila expostos e disponíveis para formarem ligações de hidrogênio com a água. A maioria das células vegetais possui a capacidade de sintetizar amido (ver Figura 20-2), e o seu armazenamento é especialmente abundante em tubérculos – como a batata – e em sementes.

O **amido** contém dois tipos de polímero de glicose, amilose e amilopectina (**Figura 7-13**). A amilose consiste em cadeias longas, não ramificadas, de resíduos de D-glicose conectados por ligações ($\alpha$1→4) (como na maltose). A massa molecular dessas cadeias varia entre alguns milhares até mais de um milhão. A amilopectina também tem massa molecular elevada (até 200 milhões), mas, ao contrário da amilose, é altamente ramificada. As ligações glicosídicas que unem os resíduos de glicose sucessivos nas cadeias de amilopectina são ($\alpha$1→4); nos pontos de ramificação (que ocorrem a cada 24 a 30 resíduos) são ligações ($\alpha$1→6).

O **glicogênio** é o principal polissacarídeo de armazenamento das células animais. Como a amilopectina, o glicogênio é um polímero de subunidades de glicose ligadas por ligações ($\alpha$1→4), com ligações ($\alpha$1→6) nas ramificações; o glicogênio, porém, é mais ramificado (em média a cada 8 a 12 resíduos) e mais compacto do que o amido. O glicogênio é especialmente abundante no fígado, onde pode constituir até 7% do peso líquido; ele também está presente no músculo esquelético. Nos hepatócitos, o glicogênio é encontrado em grandes grânulos, os quais são agrupamentos de grânulos menores compostos por moléculas únicas de glicogênio, altamente ramificadas, com massa molecular média de alguns milhões. Esses grânulos de glicogênio também apresentam, firmemente ligadas, as enzimas responsáveis pela síntese e degradação do glicogênio.

Como cada ramificação do glicogênio termina com uma unidade de açúcar não redutora, uma molécula de glicogênio com $n$ ramificações tem $n + 1$ extremidades não redutoras, mas apenas uma extremidade redutora. Quando o glicogênio é utilizado como fonte de energia, as unidades de

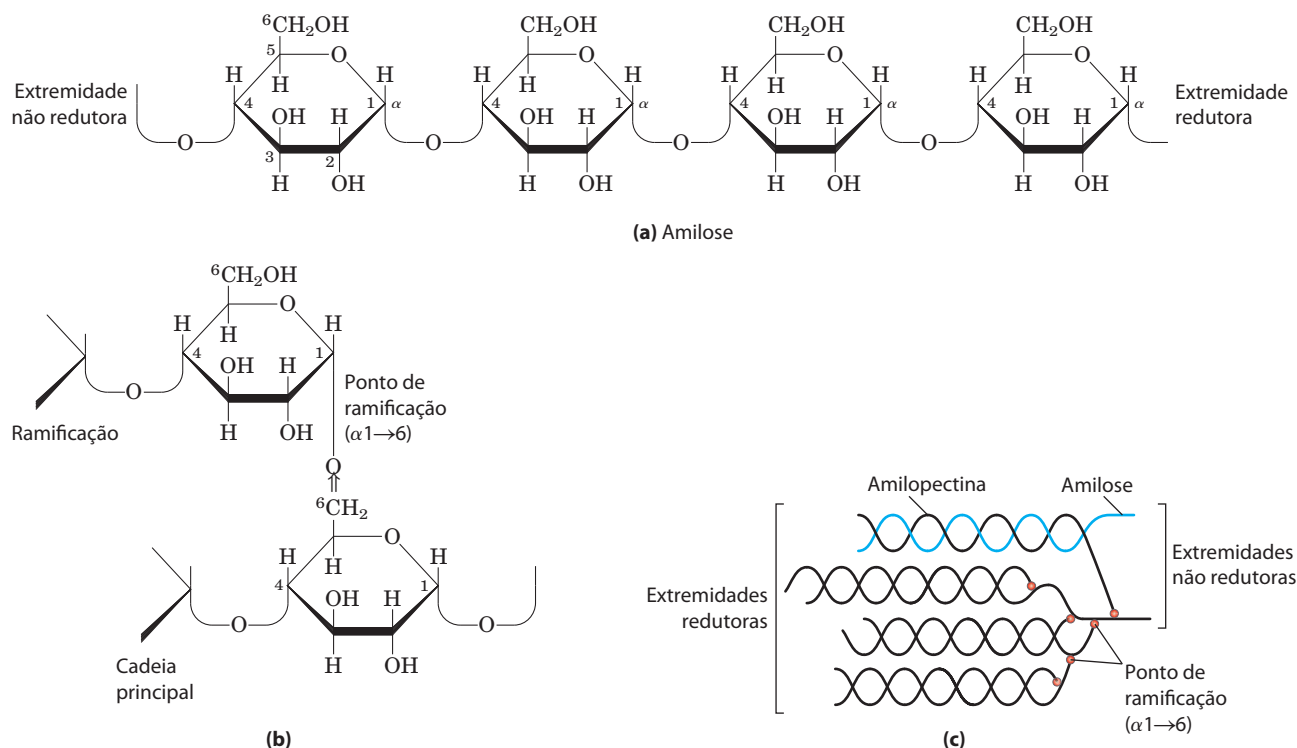



**FIGURA 7-13** **Glicogênio e amido. (a)** Segmento curto de amilose, polímero linear de resíduos de D-glicose em ligações ($\alpha$1→4). Uma única cadeia pode conter alguns milhares de resíduos de glicose. A amilopectina tem trechos de resíduos ligados de maneira similar, situados entre pontos de ramificação. O glicogênio tem a mesma estrutura básica, porém é mais ramificado do que a amilopectina. **(b)** Ponto de ramificação ($\alpha$1→6) no glicogênio ou na amilopectina. **(c)** Agrupamento de amilose e amilopectina como o que supostamente ocorre nos grânulos de amido. Fitas de amilopectina (em preto) formam estruturas em hélice dupla umas com as outras ou com fitas de amilose (em azul). A amilopectina tem pontos de ramificação ($\alpha$1→6) frequentes (em vermelho). Os resíduos de glicose nas extremidades não redutoras das ramificações mais externas são removidos enzimaticamente durante a mobilização do amido para produção de energia. O glicogênio tem estrutura similar; porém, é mais ramificado e mais compacto.

glicose são removidas uma de cada vez a partir da extremidade não redutora. As enzimas de degradação que atuam somente em extremidades não redutoras podem trabalhar simultaneamente nas muitas ramificações, acelerando a conversão do polímero em monossacarídeos.

Por que não armazenar a glicose em sua forma monomérica? Calcula-se que os hepatócitos armazenam uma concentração de glicogênio equivalente a 0,4 M de glicose. A concentração existente de glicogênio, que é insolúvel e contribui pouco para a osmolaridade do citosol, é de cerca de 0,01 $\mu$M. Se o citosol contivesse 0,4 M de glicose, a osmolaridade seria perigosamente elevada, causando uma entrada osmótica de água que poderia romper a célula (ver Figura 2-13). Além disso, com a concentração de glicose interna igual a 0,4 M e a concentração externa igual a 5 mM (a concentração no sangue de um mamífero), a variação de energia livre para o transporte de glicose para dentro das células contra este gradiente de concentração tão alto seria proibitivamente grande.

As **dextranas** são polissacarídeos de bactérias e leveduras, compostos por resíduos de D-glicose em ligações ($\alpha$1→6); todos têm ramificações ($\alpha$1→3), e alguns também têm ramificações ($\alpha$1→2) ou ($\alpha$1→4). A placa dentária, formada por bactérias que crescem na superfície dos dentes, é rica em dextranas, as moléculas adesivas que permitem às bactérias grudarem-se nos dentes e umas às outras. As dextranas também fornecem uma fonte de glicose para o metabolismo bacteriano. Dextranas sintéticas são utilizadas em alguns produtos comerciais (p. ex., *Sephadex*) que servem para o fracionamento de proteínas por meio de cromatografia por exclusão de tamanho (ver Figura 3-17b). As dextranas nesses produtos são quimicamente ligadas por ligações cruzadas para formarem materiais insolúveis de vários tamanhos.

## Alguns homopolissacarídeos têm funções estruturais

A **celulose** – substância fibrosa, resistente e insolúvel em água – é encontrada na parede celular de plantas, particularmente em caules, troncos e todas as porções amadeiradas do corpo da planta, e constitui grande parte da massa da madeira e quase a totalidade da massa do algodão. Como a amilose, a celulose é um homopolissacarídeo linear e não ramificado, constituído por 10.000 a 15.000 unidades de D-glicose. Entretanto, existe uma importante diferença: na celulose, os resíduos de D-glicose têm a configuração $\beta$ (**Figura 7-14**), enquanto na amilose a glicose está em configuração $\alpha$. Os resíduos de glicose na celulose estão ligados por ligações glicosídicas ($\beta$1→4), ao contrário das ligações ($\alpha$1→4) da amilose. Devido à essa diferença, as moléculas individuais de celulose e amilose dobram-se espacialmente de maneiras diferentes, dando a essas moléculas estruturas macroscópicas e propriedades físicas muito diferentes (ver a seguir). A natureza rígida e fibrosa da

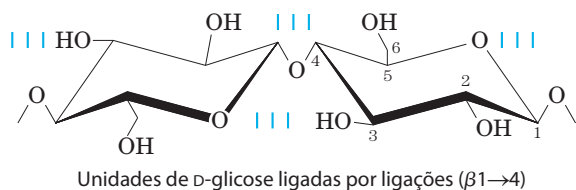



**FIGURA 7-14 Celulose.** Duas unidades de uma cadeia de celulose; os resíduos de D-glicose estão em ligações ($\beta$1→4). As rígidas estruturas em cadeira podem rotar uma em relação à outra.

celulose a torna útil para produtos comerciais como papelão e material para isolamento, e ela é um dos principais componentes dos tecidos de algodão e linho. A celulose é também a matéria-prima para a produção comercial de celofane e seda artificial (*rayon*).

O glicogênio e o amido ingeridos na dieta são hidrolisados por $\alpha$-amilases e glicosidases, enzimas presentes na saliva e no intestino que rompem ligações glicosídicas ($\alpha$1→4) entre as unidades de glicose. A maioria dos animais vertebrados não consegue utilizar a celulose como uma fonte combustível, pois eles carecem de uma enzima que hidrolise ligações ($\beta$1→4). Os cupins digerem a celulose (e, portanto, a madeira) prontamente, mas somente porque carregam no trato intestinal um microrganismo simbiótico, *Trichonympha*, que secreta celulase, enzima que hidrolisa as ligações ($\beta$1→4) (**Figura 7-15**). Estudos de genética molecular têm revelado que os genes que codificam as enzimas para a degradação da celulose estão presentes nos genomas de uma ampla gama de animais invertebrados, incluindo artrópodes e nematódeos. Existe uma exceção importante para a ausência da celulase nos vertebrados: os animais ruminantes, tais como gado, ovelhas e cabras, carregam no rúmen (o primeiro dos quatro compartimentos de seus estômagos) microrganismos simbióticos que conseguem hidrolisar a celulose, permitindo que estes animais degradem a celulose das gramíneas macias de sua dieta, mas não de plantas arbustivas. A fermentação no rúmen gera acetato, propionato e $\beta$-hidroxibutirato, que o animal utiliza para sintetizar os açúcares do leite (p. 560).

**FIGURA 7-15 Degradação da celulose por *Trichonympha*, protista do estômago dos cupins da madeira.** O *Trichonympha* produz a enzima celulase, que hidrolisa as ligações glicosídicas ($\beta$1→4) da celulose, tornando a madeira uma fonte metabolizável de açúcar (glicose) para o protista e para o cupim. Embora diversos invertebrados consigam digerir a celulose, apenas alguns vertebrados o fazem (os ruminantes, como o gado, as ovelhas e as cabras); os ruminantes são capazes de utilizar a celulose como alimento porque o primeiro dos seus quatro compartimentos estomacais (o rúmen) é colonizado por bactérias e protistas que secretam celulase.

A biomassa (tal como a gramínea *Panicum virgatum*) rica em celulose pode ser utilizada como matéria-prima para a fermentação de carboidratos a etanol, para ser utilizado com um aditivo na gasolina. A produção de biomassa anual na Terra (realizada principalmente pelos organismos fotossintéticos) é o equivalente energético de aproximadamente um trilhão de barris de petróleo, quando convertida a etanol por meio da fermentação. Devido à sua potencial utilidade para a conversão de biomassa em bioenergia, as enzimas que degradam a celulose, tais como a celulase, estão sob intensa investigação. Complexos supramoleculares chamados celulosomos, encontrados na superfície externa da bactéria *Clostridium cellulolyticum*, incluem a subunidade catalítica da celulase, juntamente com proteínas que unem uma ou mais moléculas de celulase à superfície bacteriana, e uma subunidade que se liga à celulose e a posiciona no sítio catalítico.

Uma fração principal da biomassa fotossintética está na porção amadeirada das plantas e árvores, a qual consiste em celulose e outros polímeros derivados de carboidratos não facilmente digeríveis, tanto química como biologicamente. As ligninas, por exemplo, formam aproximadamente 30% da massa da madeira. Sintetizadas a partir de precursores que incluem a fenilalanina e a glicose, as ligninas são polímeros complexos com ligações cruzadas covalentes com a celulose que complicam a digestão da celulose pela celulase. Para que as plantas lenhosas sejam utilizadas para a produção de etanol a partir de biomassa, maneiras melhores para digerir os componentes da madeira precisarão ser encontradas.

A **quitina** é um homopolissacarídeo linear composto por resíduos de *N*-acetilglicosamina em ligações ($\beta$1→4) (**Figura 7-16**). A única diferença química em comparação com a celulose é a substituição de um grupo de hidroxila em C-2 por um grupo de amina acetilado. A quitina forma fibras longas similares às fibras da celulose e, como a celulose, não pode ser digerida por vertebrados. A quitina é o principal componente dos exoesqueletos duros de aproximadamente 1 milhão de espécies de artrópodes – insetos, lagostas e caranguejos, por exemplo – e é provavelmente o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, depois da celulose; estima-se que 1 bilhão de toneladas de quitina são produzidas a cada ano na biosfera.

## Fatores estéricos e ligações de hidrogênio influenciam o enovelamento dos homopolissacarídeos

O enovelamento de polissacarídeos em três dimensões segue os mesmos princípios que governam a estrutura de polipeptídeos. Subunidades com estrutura relativamente rígida ditada por ligações covalentes formam estruturas macromoleculares tridimensionais estabilizadas por interações fracas dentro da própria molécula ou intermoleculares, tais como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações de van der Waals e, para polímeros com subunidades carregadas, interações eletrostáticas. Como os polissacarídeos têm muitos grupos hidroxila, as ligações de hidrogênio

(a)

(b)

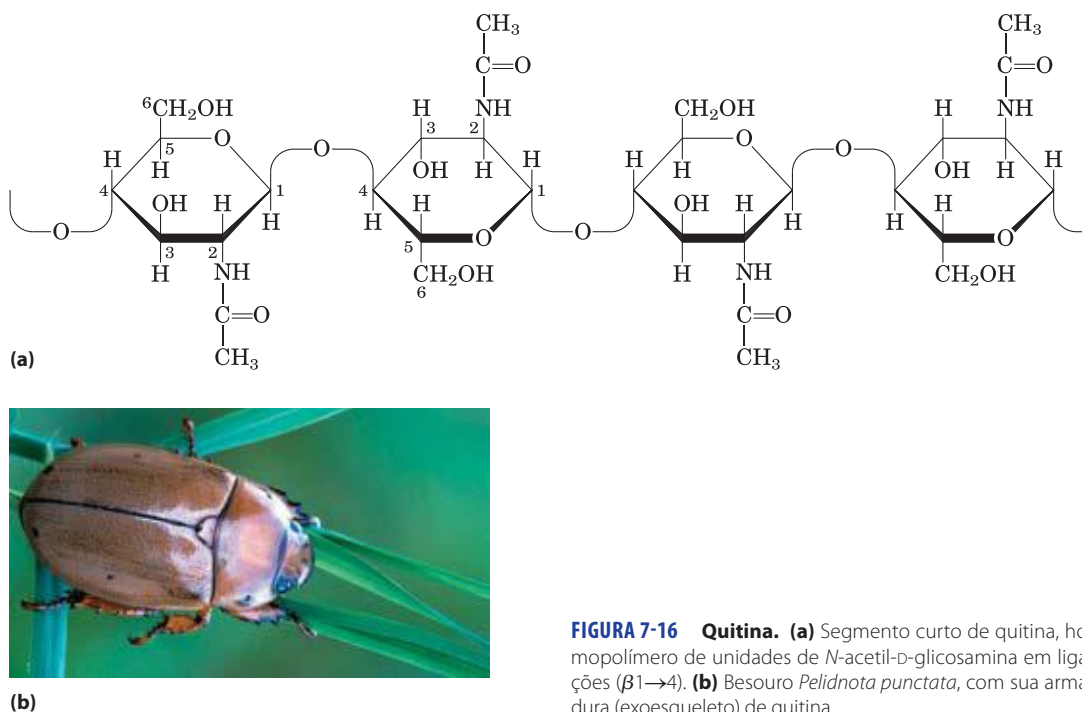



**FIGURA 7-16 Quitina. (a)** Segmento curto de quitina, homopolímero de unidades de *N*-acetil-D-glicosamina em ligações ($\beta$1→4). **(b)** Besouro *Pelidnota punctata*, com sua armadura (exoesqueleto) de quitina.

têm uma influência especialmente importante em suas estruturas. O glicogênio, o amido e a celulose são compostos por subunidades de piranose (o anel de seis membros), assim como os oligossacarídeos de glicoproteínas e glicolipídeos a serem discutidos a seguir. Tais moléculas podem ser representadas como uma série de rígidos anéis de piranose conectados por um átomo de oxigênio que une dois átomos de carbono (a ligação glicosídica). Existe, em princípio, livre rotação ao redor de ambas as ligações C-O que ligam os resíduos (Figura 7-14), porém, como nos polipeptídeos (ver Figuras 4-2 e 4-9), a rotação ao redor de cada ligação é limitada pelo impedimento estérico gerado pelos substituintes. As estruturas tridimensionais dessas moléculas podem ser descritas nos termos dos ângulos de diedro, da ligação glicosídica (**Figura 7-17**), análogos aos ângulos $\phi$ e $\psi$ formados pela ligação peptídica (ver Figura 4-2).

O volume do anel de piranose e seus substituintes, e os efeitos eletrônicos sobre o carbono anomérico, constringem os ângulos $\phi$ e $\psi$; assim, certas conformações são muito mais estáveis do que outras, como pode ser mostrado por um mapa da energia em função destes ângulos (**Figura 7-18**).

A estrutura tridimensional mais estável para as cadeias ligadas por ligações ($\alpha$1→4) do amido e do glicogênio é uma hélice firmemente enrolada (**Figura 7-19**), estabilizada por ligações de hidrogênio entre as cadeias. Na amilose, que não é ramificada, essa estrutura é regular o suficiente para permitir a cristalização e, portanto, a determinação da estrutura por difração de raios X. O plano médio de cada resíduo ao longo da cadeia da amilose forma um ângulo de 60° com o plano médio do resíduo predecessor, de modo que a estrutura em hélice tem seis resíduos por volta. Para a amilose, o centro da hélice tem

Celulose
Repetições de ($\beta$1→4)Glc

Amilose
Repetições de ($\alpha$1→4)Glc

Dextrana
Repetições de ($\alpha$1→6)Glc (com ramificações ($\alpha$1→3), não mostradas)

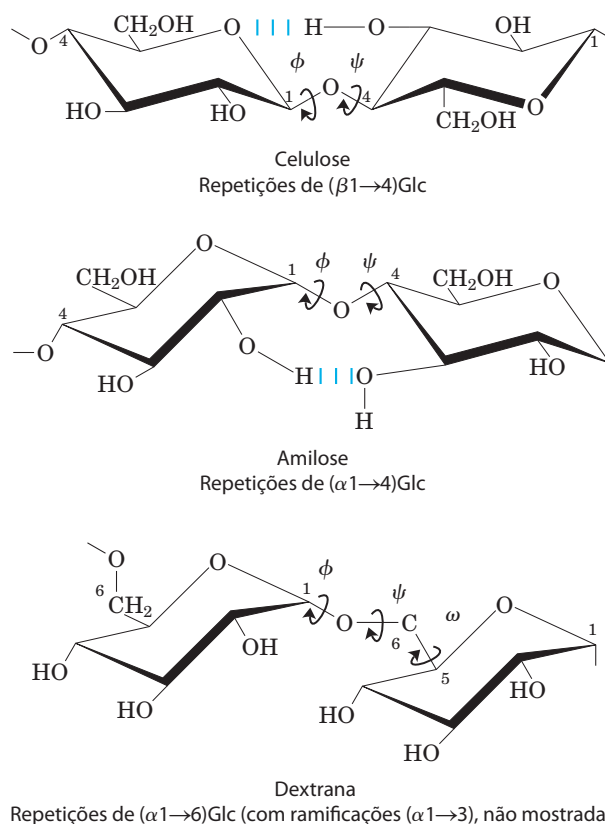



**FIGURA 7-17 Conformação das ligações glicosídicas da celulose, amilose e dextrana.** Os polímeros estão representados como rígidos anéis de piranose unidos por ligações glicosídicas, com livre rotação ao redor dessas ligações. Observe que na dextrana também existe livre rotação ao redor da ligação entre C-5 e C-6 (o ângulo de torção $\omega$ [ômega]).

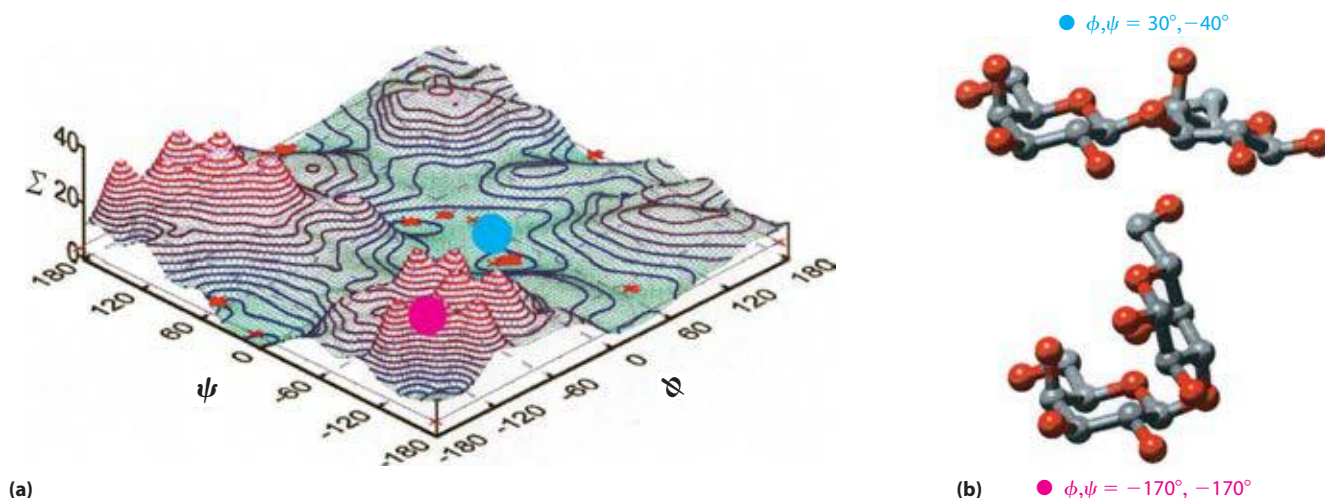



**FIGURA 7-18 Mapa das conformações mais comuns em oligossacarídeos e polissacarídeos.** Os ângulos de torção $\phi$ e $\psi$ (ver Figura 7-17), que definem as relações espaciais entre anéis adjacentes, podem, em princípio, ter qualquer valor entre 0° e 360°. Na verdade, alguns dos ângulos de torção originariam conformações estericamente impedidas, enquanto outros originam conformações que maximizam a formação de ligações de hidrogênio. **(a)** Quando a energia relativa (Σ) para cada valor de $\phi$ e $\psi$ é representada em um gráfico, com os contornos de isoenergia ("mesma energia") representados em intervalos de 1 kcal/mol acima do estado de energia mínima, o resultado é um mapa das conformações preferenciais. Este mapa é análogo ao gráfico de Ramachandran para peptídeos (ver Figuras 4-3 e 4-9). **(b)** Dois extremos energéticos para o dissacarídeo Gal($\beta$1⟶3)Gal; estes valores estão representados no diagrama de energia (a) pelos círculos vermelho e azul. O círculo vermelho indica a conformação menos favorecida; o círculo azul indica a conformação mais favorecida. As conformações conhecidas dos três polissacarídeos mostrados na Figura 7-17 foram determinadas por cristalografia por raios X e todas estão dentro das regiões de menor energia do mapa.

precisamente as dimensões corretas para acomodar íons complexos de iodo ($I_3^-$ e $I_5^-$), formando um complexo azul intenso. Essa interação é a base de um teste qualitativo comum para a presença de amilose.

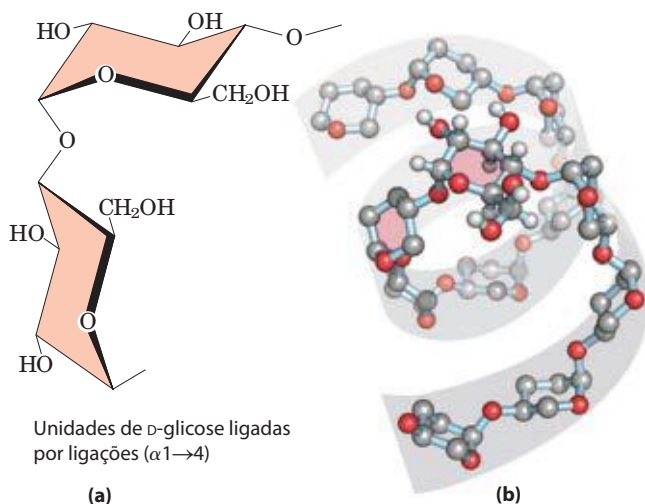



**FIGURA 7-19 A estrutura helicoidal do amido (amilose). (a)** Na conformação mais estável, por causa das rígidas cadeiras adjacentes, a cadeia polissacarídica é curva, em vez de reta como a da celulose (ver Figura 7-14). **(b)** Modelo de um segmento da amilose; para maior clareza, os grupos hidroxila de apenas um resíduo de glicose estão representados. Compare os dois resíduos sombreados em cor salmão com as estruturas químicas em (a). Pela conformação das ligações ($\alpha$1⟶4) na amilose, na amilopectina e no glicogênio, estes polímeros formam estruturas firmes em hélice enrolada. Estas estruturas compactas originam os densos grânulos de armazenamento de amido ou glicogênio observados em muitas células (ver Figura 20-2).

Para a celulose, a conformação mais estável é aquela na qual cada cadeira gira 180° em relação aos vizinhos, o que gera uma cadeia reta e estendida. Todos os grupos –OH estão disponíveis para ligações de hidrogênio com as cadeias vizinhas. Com algumas cadeias estendendo-se lado a lado, uma rede estabilizada por ligações de hidrogênio intercadeia e intracadeia produz fibras supramoleculares retas e estáveis, com grande resistência à tensão (**Figura 7-20**). Essa propriedade da celulose a tem feito uma substância útil para as civilizações por milênios. Muitos produtos manufaturados, incluindo papiro, papel, papelão, viscose, isolantes e vários outros materiais úteis, são derivados da celulose. O conteúdo de água desses materiais é baixo porque o grande número de ligações de hidrogênio entre as cadeias das moléculas de celulose esgota sua capacidade para formação de ligações de hidrogênio.

## As paredes celulares de bactérias e algas contêm heteropolissacarídeos estruturais

O componente rígido das paredes celulares bacterianas (o peptidoglicano) é um heteropolímero de resíduos alternados de *N*-acetilglicosamina e ácido *N*-acetilmurâmico unidos por ligações ($\beta$1⟶4) (ver Figura 20-30). Os polímeros lineares encontram-se lado a lado na parede celular, cruzadamente ligados por peptídeos curtos, cuja estrutura exata depende da espécie bacteriana. As ligações cruzadas dos peptídeos juntam as cadeias de polissacarídeo em uma bainha resistente (peptidoglicano) que envolve a célula inteira e impede o inchaço e a lise celular devidos à entrada osmótica de água. A enzima lisozima é bactericida por hidrolisar as ligações glicosídicas ($\beta$1⟶4) entre *N*-acetilglicosamina

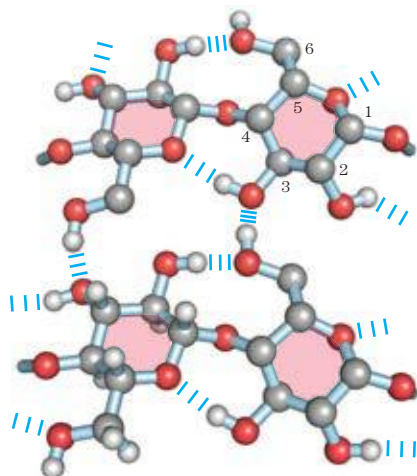



**FIGURA 7-20 Cadeias de celulose.** Representação em escala de segmentos de duas cadeias de celulose paralelas, mostrando a conformação dos resíduos de D-glicose e as ligações de hidrogênio formando ligações cruzadas. Na unidade de hexose embaixo à esquerda, estão representados todos os átomos de hidrogênio; nas outras três unidades de hexose, os hidrogênios ligados ao carbono foram omitidos para maior clareza, já que não participam de ligações de hidrogênio.

Agarose
3)D-Gal($\beta$1→4)3,6-anidro-L-Gal2S
(unidades de repetição $\alpha$1)

**FIGURA 7-21 Agarose.** As unidades repetidas da agarose são constituídas por D-galactose unidas por ligação ($\beta$1→4) a 3,6-anidro-L-galactose (na qual uma ligação éter conecta C-3 e C-6). Essas unidades são ligadas por ligações glicosídicas ($\alpha$1→3), formando polímeros com um comprimento de 600 a 700 resíduos. Uma pequena fração dos resíduos de 3,6-anidro-L-galactose contém um éster de sulfato em C-2 (como mostrado aqui). Os parênteses abertos no nome sistemático indicam que as unidades repetidas estendem-se a partir das duas extremidades.

e ácido *N*-acetilmurâmico (ver Figura 6-27); essa enzima é encontrada nas lágrimas dos seres humanos, onde é presumivelmente uma defesa contra infecções bacterianas nos olhos, e é também produzida por certos vírus de bactérias para garantir que o vírus seja liberado de dentro da célula bacteriana hospedeira, etapa essencial do ciclo de infecção viral. A penicilina e os antibióticos relacionados são bactericidas por impedirem a formação das ligações cruzadas, tornando a parede celular muito fraca para resistir à lise osmótica (ver p. 224).

Certas algas marinhas vermelhas têm paredes celulares que contêm **ágar**, mistura de heteropolissacarídeos sulfatados compostos por D-galactose e um derivado de L-galactose, unidos entre C-3 e C-6 por uma ligação éter. O ágar é uma complexa mistura de polissacarídeos, todos com o mesmo esqueleto estrutural, mas sendo substituídos por diferentes quantidades de sulfato e piruvato. A **agarose** ($M_r$ ~150.000) é o componente do ágar que possui menos grupamentos carregados (sulfatos, piruvatos) (**Figura 7-21**). Sua propriedade singular de formar géis a torna útil nos laboratórios de bioquímica. Quando uma suspensão de agarose em água é aquecida e depois resfriada, a agarose forma uma hélice dupla: duas moléculas em orientação paralela se enrolam uma na outra, com uma volta da hélice a cada três resíduos; moléculas de água ficam retidas na cavidade central. Essas estruturas helicoidais se associam umas com as outras para formar um gel – uma matriz tridimensional que retém grandes quantidades de água. Géis de agarose são utilizados como suportes inertes para a separação eletroforética de ácidos nucleicos, uma parte essencial do processo de sequenciamento de DNA (p. 302). O ágar também é utilizado para formar uma superfície para o crescimento de colônias bacterianas. Outra utilidade comercial do ágar é a produção de cápsulas, nas quais alguns medicamentos e vitaminas são encapsulados; o ágar seco dissolve-se prontamente no estômago e é metabolicamente inerte.

## Os glicosaminoglicanos são heteropolissacarídeos da matriz extracelular

O espaço extracelular dos tecidos dos animais multicelulares é preenchido com um material semelhante a gel, a **matriz extracelular** (**MEC**), também chamada de substância fundamental, que mantém as células unidas e provê um meio poroso para a difusão de nutrientes e oxigênio para cada célula. A MEC, que circunda fibroblastos e outras células do tecido conectivo, é composta por uma rede entrelaçada de polissacarídeos e proteínas fibrosas, como colágenos, elastinas e fibronectinas fibrilares. A membrana basal é uma MEC especializada sobre a qual se assentam as células epiteliais; ela é constituída por colágenos especializados, lamininas e heteropolissacarídeos. Esses heteropolissacarídeos, os **glicosaminoglicanos**, formam uma família de polímeros lineares compostos por unidades de dissacarídeo repetidas (**Figura 7-22**). Os glicosaminoglicanos são exclusivos de animais e bactérias, não sendo encontrados em plantas. Um dos dois monossacarídeos é obrigatoriamente *N*-acetilglicosamina ou *N*-acetilgalactosamina; o outro, na maioria dos casos, é um ácido urônico, geralmente ácido D-glicurônico ou ácido L-idurônico. Alguns glicosaminoglicanos contêm grupos sulfato esterificados. A combinação dos grupos sulfato com os grupos carboxilato dos resíduos de ácido urônico gera uma densidade muito grande de cargas negativas. Para minimizar as forças de repulsão entre grupos vizinhos carregados, essas moléculas adotam em solução uma conformação estendida, formando uma hélice em formato de bastão na qual os grupos carboxilato negativamente carregados situam-se em lados alternados da hélice (como mostrado para a heparina na Figura 7-22). O formato de bastão estendido também leva à maior separação possível entre os grupos sulfato negativamente carregados. O padrão de resíduos de açúcar sulfatados e não sulfatados específico para cada glicosaminoglicano proporciona que diferentes ligantes proteicos, os quais se ligam eletrostaticamente aos glicosaminaglicanos, sejam reconhecidos especificamente. Os glicosaminoglicanos sulfatados são ligados a proteínas extracelulares para formarem proteoglicanos (Seção 7.3).

O glicosaminoglicano **ácido hialurônico** (hialuronana) contém resíduos alternados de ácido D-glicurônico e *N*-ace-

**FIGURA 7-22 Unidades repetidas de alguns glicosaminoglicanos comuns na matriz extracelular.** Os glicosaminoglicanos são copolímeros de resíduos alternados de ácido urônico e aminoaçúcares (o queratan--sulfato é uma exceção), com ésteres de sulfato presentes em diferentes posições, exceto no ácido hialurônico. Os grupos ionizados carboxilato e sulfato (em vermelho nas fórmulas em perspectiva) criam a alta carga negativa característica destes polímeros. A heparina utilizada terapeuticamente contém principalmente ácido idurônico (IdoA) e uma proporção menor de ácido glicurônico (GlcA, não mostrado), em geral sendo altamente sulfatada e de comprimento heterogêneo. O modelo em volume atômico mostra um segmento da estrutura da heparina em solução, como determinada por espectroscopia de RMN (PDB ID 1HPN). Os carbonos no sulfato do ácido idurônico estão em azul; os carbonos no sulfato de glicosamina estão em verde. O oxigênio e o enxofre estão representados nas cores vermelho e amarelo, respectivamente. Os átomos de hidrogênio não estão mostrados (para maior clareza). O heparan-sulfato (não mostrado) é similar à heparina, mas contém uma proporção maior de GlcA e menos grupos sulfato, distribuídos em um padrão menos regular.

tilglicosamina (Figura 7-22). Contendo até 50.000 repetições da unidade dissacarídica básica, o ácido hialurônico tem massa molecular de alguns milhões; ele forma soluções claras, altamente viscosas, que funcionam como lubrificantes no líquido sinovial das articulações e geram a consistência gelatinosa do humor vítreo nos olhos dos vertebrados (a palavra grega *hyalos* significa "vidro"; o ácido hialurônico pode ter aparência vítrea ou translúcida). O ácido hialurônico também é um componente da matriz extracelular de cartilagens e tendões, onde auxilia na resistência à tensão e elasticidade, devido à sua forte interação não covalente com outros componentes da matriz. A hialuronidase, enzima secretada por certas bactérias patogênicas, hidrolisa as ligações glicosídicas do ácido hialurônico, tornando os tecidos mais suscetíveis à infecção bacteriana. Em muitas espécies animais, uma enzima similar presente no espermatozoide hidrolisa o revestimento de glicosaminoglicano que envolve o óvulo, permitindo a penetração do espermatozoide.

Os outros glicosaminoglicanos diferem do ácido hialurônico em três aspectos: em geral são polímeros muito mais curtos, estão covalentemente ligados a proteínas específicas (proteoglicanos), e uma ou as duas unidades monoméricas são diferentes daquelas do ácido hialurônico. O **sulfato de condroitina** (do grego *chondros*, "cartilagem") auxilia na resistência à tensão das cartilagens, dos tendões, dos ligamentos e das paredes da aorta. O dermatan-sulfato (do grego *derma*, "pele") auxilia na flexibilidade da pele e também está presente em vasos sanguíneos e válvulas cardíacas. Nesse polímero, muitos dos resíduos de glicuronato presentes no sulfato de condroitina estão substituídos por seu 5-epímero, L-iduronato(IdoA).

α-L-Iduronato (IdoA)

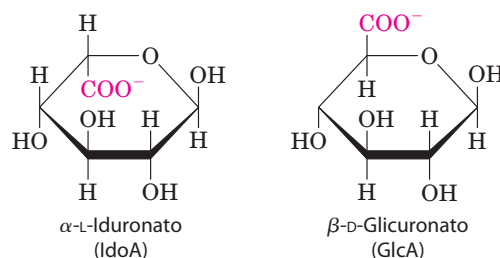
β-D-Glicuronato (GlcA)

Os **queratan-sulfatos** (do grego *keras*, "chifre") não contêm ácido urônico, e o conteúdo de sulfato é variável. Estão presentes em cartilagens, ossos e várias estruturas córneas formadas por células mortas: chifres, cabelos, cascos, unhas e garras. O **heparan-sulfato** (do grego *hépar*, "fígado"; originalmente isolado de fígado de cachorro) é sintetizado por todas as células animais e contém arranjos variados de açúcares sulfatados e não sulfatados. Os segmentos sulfatados da cadeia permitem a interação com um grande número de proteínas, incluindo fatores de cresci-

**FIGURA 7-23 Interação entre um glicosaminoglicano e sua proteína ligante.** O fator 1 de crescimento de fibroblastos (FGF1), seu receptor na superfície celular (FGFR) e um curto segmento de um glicosaminoglicano (heparina) foram cocristalizados para gerar a estrutura mostrada aqui (PDB ID 1E0O). As proteínas estão representadas por imagens de contorno da superfície, com as cores representando o potencial eletrostático predominante da superfície: vermelho, carga negativa; azul, carga positiva. A heparina está representada no modelo de esfera e bastão, com as cargas negativas ($—SO_3^-$ e $–COO^-$) atraídas para a superfície positiva (azul) da proteína FGF1. A heparina foi utilizada neste experimento, mas o glicosaminoglicano que se liga ao FGF1 *in vivo* é o heparan-sulfato presente na superfície celular.

mento e componentes da matriz extracelular, assim como várias enzimas e fatores presentes no plasma. A heparina é uma forma fracionada do heparan-sulfato, derivada principalmente de mastócitos (tipo de leucócito). Ela é um agente terapêutico utilizado para inibir a coagulação sanguínea por sua capacidade de se ligar à antitrombina, um inibidor de proteases. A ligação da heparina leva a antitrombina a se ligar e inibir a trombina, protease essencial para a coagulação do sangue. Essa interação é fortemente eletrostática; a heparina tem a maior densidade de cargas negativas que a de qualquer macromolécula biológica conhecida (**Figura 7-23**). A heparina purificada costuma ser adicionada a amostras de sangue coletadas para análises clínicas e ao sangue doado para transfusão, para impedir a coagulação.

A Tabela 7-2 descreve a composição, as propriedades, as funções e a ocorrência dos polissacarídeos descritos na Seção 7.2.

**TABELA 7-2** Estruturas e funções de alguns polissacarídeos

| Polímero | Tipo* | Unidade repetida† | Tamanho (número de unidades monossacarídicas) | Função/importância |
|---|---|---|---|---|
| Amido | | | | |
| Amilose<br>Amilopectina | Homo-<br>Homo- | ($\alpha$1→4)Glc, linear<br>($\alpha$1→4)Glc, com ramificações ($\alpha$1→6)Glc a cada 24-30 resíduos | 50-5.000<br>Até $10^6$ | Armazenamento de energia: em plantas |
| Glicogênio | Homo- | ($\alpha$1→4)Glc, com ramificações ($\alpha$1→6)Glc a cada 8 a 12 resíduos | Até 50.000 | Armazenamento de energia: em células bacterianas e animais |
| Celulose | Homo- | ($\beta$1→4)Glc | Até 15.000 | Estrutural: em plantas, garante rigidez e força às paredes celulares |
| Quitina | Homo- | ($\beta$1→4)GlcNAc | Muito grande | Estrutural: em insetos, aranhas e crustáceos, garante rigidez e força ao citoesqueleto |
| Dextrana | Homo- | ($\alpha$1→6)Glc, com ramificações ($\alpha$1→3) | Vários tamanhos | Estrutural: em bactérias, adesão extracelular |
| Peptidoglicano | Hetero-; ligado a peptídeos | 4)Mur2Ac($\beta$1→4)GlcNAc($\beta$1 | Muito grande | Estrutural: em bactérias, garante rigidez e força ao envelope celular |
| Agarose | Hetero- | 3)D-Gal($\beta$1→4)3,6-anidro-L-Gal($\alpha$1 | 1.000 | Estrutural: em algas, material da parede celular |
| Ácido hialurônico (glicosaminoglicano) | Hetero-; ácido | 4)GlcA($\beta$1→3)GlcNAc($\beta$1 | Até 100.000 | Estrutural: em vertebrados, na matriz extracelular da pele e do tecido conectivo; viscosidade e lubrificação em articulações |

*Cada polímero está classificado como um homopolissacarídeo (homo-) ou heteropolissacarídeo (hetero-).
†Os nomes abreviados das unidades repetidas do peptidoglicano, agarose e ácido hialurônico indicam que o polímero contém repetições desta unidade dissacarídica. Por exemplo, no peptidoglicano, o GlcNAc de uma unidade dissacarídica está ligado em ($\beta$1→4) ao primeiro resíduo da próxima unidade dissacarídica.

**RESUMO 7.2 Polissacarídeos**

- Os polissacarídeos (glicanos) servem para o armazenamento de combustível e como componentes estruturais da parede celular e da matriz extracelular.
- Os homopolissacarídeos amido e glicogênio armazenam combustível em células vegetais, animais e bacterianas. São constituídos por D-glicose com ligações ($\alpha1\rightarrow4$), e ambos contêm algumas ramificações.
- Os homopolissacarídeos celulose, quitina e dextrana têm funções estruturais. A celulose, composta por resíduos de D-glicose em ligações ($\beta1\rightarrow4$), garante força e rigidez à parede celular de plantas. A quitina, um polímero de *N*-acetilglicosamina com ligações ($\beta1\rightarrow4$), fortalece o exoesqueleto de artrópodes. A dextrana forma um revestimento aderente ao redor de certas bactérias.
- Os homopolissacarídeos se dobram em três dimensões. A forma em cadeira do anel piranose é essencialmente rígida, de modo que a conformação dos polímeros é determinada pela rotação das ligações entre os anéis e o átomo de oxigênio na ligação glicosídica. O amido e o glicogênio formam estruturas helicoidais com ligações de hidrogênio dentro da própria cadeia; a celulose e a quitina formam fitas longas e retas que interagem com as fitas vizinhas.
- As paredes celulares de algas e bactérias são fortalecidas por heteropolissacarídeos – peptidoglicano em bactérias, ágar em algas. O dissacarídeo que se repete no peptidoglicano é GlcNAc($\beta1\rightarrow4$)Mur2Ac; no ágar, é D-Gal($\beta1\rightarrow4$)3,6-anidro-L-Gal.
- Os glicosaminoglicanos são heteropolissacarídeos extracelulares nos quais uma das duas unidades de monossacarídeo é um ácido urônico (o queratan-sulfato é uma exceção) e a outra é um aminoaçúcar *N*-acetilado. Ésteres de sulfato em alguns dos grupos hidroxila e em alguns dos grupos amino de certos resíduos de glicosamina na heparina e no heparan-sulfato dão a esses polímeros uma alta densidade de cargas negativas, forçando-os a adotarem conformações estendidas. Esses polímeros (ácido hialurônico, sulfato de condroitina, dermatan-sulfato e queratan-sulfato) garantem à matriz extracelular viscosidade, adesão e resistência à compressão.

## 7.3 Glicoconjugados: proteoglicanos, glicoproteínas e glicoesfingolipídeos

Além dos importantes papéis como armazenadores de combustível (amido, glicogênio, dextrana) e como material estrutural (celulose, quitina, peptidoglicanos), os polissacarídeos e oligossacarídeos são transportadores de informação. Alguns fornecem comunicação entre as células e a matriz extracelular circundante; outros sinalizam proteínas para o transporte e a localização em organelas específicas, ou para degradação, quando a proteína é malformada ou supérflua; e outros atuam como pontos de reconhecimento para moléculas de sinalização extracelulares (fatores de crescimento, por exemplo) ou parasitas extracelulares (bactérias e vírus). Em praticamente todas as células eucarióticas, cadeias de oligossacarídeos específicos ligadas a componentes da membrana plasmática formam uma camada de carboidratos (o glicocálice) com alguns nanômetros de espessura, que serve como uma superfície rica em informações que a célula expõe para o meio exterior. Esses oligossacarídeos são componentes centrais para reconhecimento e adesão entre células, migração celular durante o desenvolvimento, coagulação sanguínea, resposta imune, cicatrização de ferimentos e outros processos celulares. Na maioria desses casos, o carboidrato que carrega a informação está covalentemente ligado a uma proteína ou lipídeo, formando um **glicoconjugado**, molécula biologicamente ativa (**Figura 7-24**).

Os **proteoglicanos** são macromoléculas da superfície celular ou da matriz extracelular nas quais uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos sulfatados estão covalentemente unidas a uma proteína de membrana ou a uma proteína secretada. A cadeia de glicosaminoglicano pode ligar-se a proteínas extracelulares por meio de interações eletrostáticas entre a proteína e os açúcares negativamente carregados do proteoglicano. Os proteoglicanos são os principais componentes de todas as matrizes extracelulares.

As **glicoproteínas** têm um ou alguns oligossacarídeos de complexidades variadas, unidos covalentemente a uma proteína. Costumam ser encontradas na superfície externa da membrana plasmática (como parte do glicocálice), na matriz extracelular e no sangue. Nas células, são encontradas em organelas específicas, como aparelho de Golgi, grânulos de secreção e lisossomos. As porções oligossacarídicas das glicoproteínas são muito heterogêneas e, assim como os glicosaminoglicanos, são ricas em informação, for-

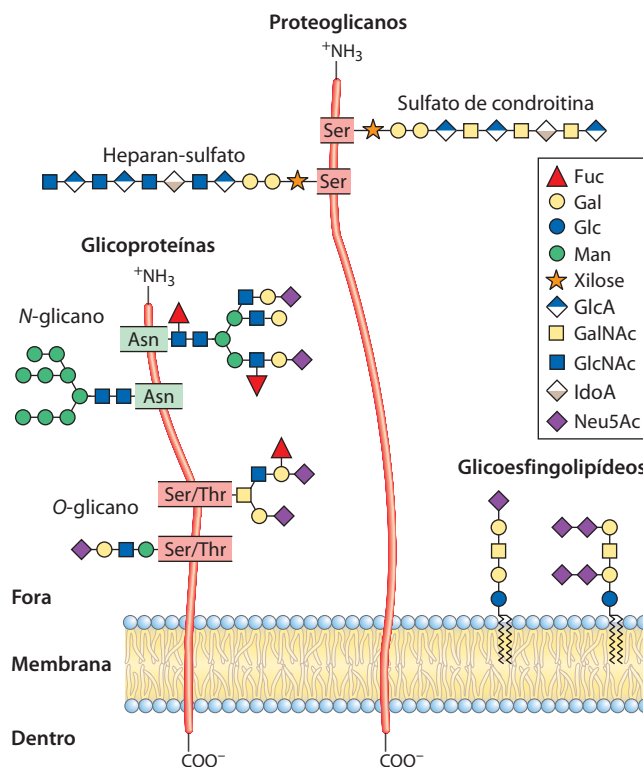



**FIGURA 7-24 Glicoconjugados.** As estruturas de alguns proteoglicanos, glicoproteínas e glicoesfingolipídeos típicos descritos no texto.

mando locais extremamente específicos para o reconhecimento e a ligação de alta afinidade por proteínas ligantes de carboidratos, chamadas de lectinas. Algumas proteínas citosólicas e nucleares também podem ser glicosiladas.

Os **glicoesfingolipídeos** são componentes da membrana plasmática nos quais o grupo hidrofílico da cabeça é um oligossacarídeo. Como nas glicoproteínas, os oligossacarídeos servem como pontos específicos para o reconhecimento por lectinas. O cérebro e os neurônios são ricos em glicoesfingolipídeos, os quais auxiliam na condução nervosa e na formação da mielina. Os glicoesfingolipídeos também são importantes para a transdução de sinal celular. Esfingolipídeos são discutidos em mais detalhes nos Capítulos 10 e 11.

## Os proteoglicanos, macromoléculas presentes na superfície celular e na matriz extracelular, contêm glicosaminoglicanos

As células de mamíferos sintetizam 40 tipos de proteoglicanos. Essas moléculas agem como organizadores de tecidos e influenciam várias atividades celulares, como a ativação de fatores de crescimento e a adesão. A unidade básica dos proteoglicanos consiste em um "cerne proteico" (proteína central) com um ou mais glicosaminoglicanos covalentemente ligados. O ponto para a ligação é um resíduo de Ser, ao qual o glicosaminoglicano é unido por meio de uma ponte tetrassacarídica (**Figura 7-25**). O resíduo de Ser geralmente está na sequência —Ser—Gly—X—Gly— (em que X é um resíduo de aminoácido), embora nem todas as proteínas contendo essa sequência estejam ligadas a um glicosaminoglicano.

Muitos proteoglicanos são secretados para a MEC, mas alguns são proteínas integrais de membrana (ver Figura 11-7). Por exemplo, a fina camada da MEC que separa grupos organizados de células de outros grupos (a lâmina basal) contém uma família de proteínas centrais ($M_r$ 20.000 a 40.000), cada qual com algumas cadeias de heparan-sulfato ligadas. Existem duas famílias principais de proteoglicanos de membrana ligados a heparan-sulfato. Os **sindecanos** têm um único domínio transmembrana e um domínio extracelular que liga entre três e cinco cadeias de heparan-sulfato e, em alguns casos, sulfato de condroitina (**Figura 7-26a**). Os **glipicanos** são ligados à membrana por uma âncora lipídica, um derivado do lipídeo de membrana fosfatidilinositol (ver Figura 11-15). Os sindecanos e os glipicanos podem ser liberados para o espaço extracelular. Uma protease da MEC capaz de clivar proteínas perto da superfície da membrana libera os ectodomínios de sindecanos (aqueles domínios externos à membrana plasmática), e uma fosfolipase que cliva a conexão com os lipídeos da membrana libera os glipicanos. Esses mecanismos possibilitam que a célula altere rapidamente as características de sua superfície. Esse processo

**FIGURA 7-25 Estrutura dos proteoglicanos, mostrando a ponte tetrassacarídica.** Típica ligação tetrassacarídica (em azul) conecta um glicosaminoglicano – neste caso, 4-sulfato de condroitina (em cor de laranja) – a um resíduo de Ser do cerne proteico. O resíduo de xilose na extremidade redutora do ligante é unido por meio do carbono anomérico ao grupo hidroxila do resíduo de Ser.

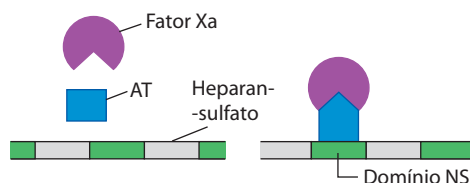
**FIGURA 7-26 Duas famílias de proteoglicanos de membrana. (a)** Diagramas esquemáticos de um sindecano e um glipicano na membrana plasmática. Os sindecanos, mantidos na membrana plasmática por interações hidrofóbicas entre uma sequência de resíduos de aminoácidos apolares e a membrana plasmática, podem ser liberados por meio de um único corte proteolítico perto da superfície da membrana. Em um sindecano típico, o domínio extracelular está covalentemente unido (por pontes tetrassacarídicas como as mostradas na Figura 7-25) a três cadeias de heparan-sulfato e duas cadeias de sulfato de condroitina. Os glipicanos são mantidos na membrana por meio de um lipídeo de membrana covalentemente ligado (âncora de GPI; ver Figura 11-15), porém são desprendidos se a ligação entre a porção lipídica da âncora de GPI (fosfatidilinositol) e o oligossacarídeo ligado à proteína for clivada por uma fosfolipase. Todos os glipicanos têm 14 resíduos de Cys conservados, os quais formam ligações dissulfeto que estabilizam a porção proteica, e duas ou três cadeias de glicosaminoglicanos ligadas próximo ao carboxiterminal, em proximidade com a superfície da membrana. **(b)** Ao longo de uma cadeia de heparan-sulfato, as regiões ricas em açúcares sulfatados, os domínios NS (em verde) alternam-se com regiões que contêm principalmente resíduos de GlcNAc e GlcA não modificados, os domínios NA (em cinza). Um dos domínios NS está mostrado com mais detalhes para ilustrar a alta densidade dos resíduos modificados: GlcNS (*N*-sulfoglicosamina) com éster de sulfato no C-6, e GlcA e IdoA com éster de sulfato em C-2. O padrão de sulfatação exato dos domínios NS varia entre proteoglicanos.

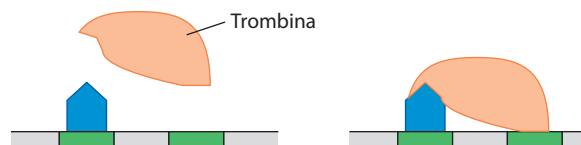
de alteração é altamente regulado e está ativado nas células em proliferação, tais como células cancerosas. A liberação dos proteoglicanos está envolvida no reconhecimento e na adesão intercelulares, e na proliferação e na diferenciação celulares. Numerosos proteoglicanos de sulfato de condroitina e dermatan-sulfato também existem, alguns como moléculas ligadas à membrana plasmática, outros como produtos secretados para a MEC.

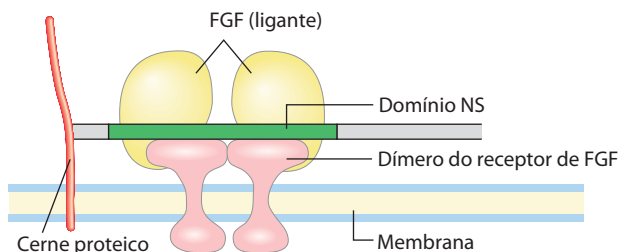
As cadeias de glicosaminoglicanos podem ligar uma variedade de ligantes extracelulares e, assim, modular a interação do ligante com receptores da superfície celular específicos. Estudos detalhados com heparan-sulfato demonstram que a estrutura dos domínios não é aleatória; alguns domínios (tipicamente com o comprimento de 3 a 8 unidades de dissacarídeo) diferem dos domínios vizinhos em sequência e capacidade de ligar proteínas específicas. Domínios altamente sulfatados (chamados de domínios NS) se alternam com domínios que têm resíduos de GlcNAc e GlcA não modificados (domínios *N*-acetilados ou NA) (Figura 7-26b). O padrão exato de sulfatação nos domínios NS depende especificamente do proteoglicano; dado o número de possíveis modificações do dímero GlcNAc-IdoA (ácido idurônico), são possíveis pelo menos 32 unidades de dissacarídeo diferentes. Além disso, a mesma proteína central pode apresentar diferentes estruturas de heparan-sulfato quando sintetizada em diferentes tipos celulares.

As moléculas de heparan-sulfato com domínios NS precisamente organizados se ligam especificamente a proteínas extracelulares e moléculas de sinalização, causando modificação nas suas atividades, o que pode ser o resultado de uma alteração conformacional na proteína, induzida pela ligação (**Figura 7-27a**), ou ocorrer devido à capacidade de domínios adjacentes do heparan-sulfato de se ligarem a duas proteínas diferentes, aproximando-as e intensificando as interações proteína-proteína (Figura 7-27b). Um terceiro mecanismo de ação geral é a ligação de moléculas de sinalização extracelulares (fatores de crescimento, por exemplo) ao heparan-sulfato, aumentando a concentração local dessas moléculas e facilitando a interação com os receptores de fatores de crescimento na superfície celular; nesse caso, o heparan-sulfato age como correceptor (Figura 7-27c). Por exemplo, o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), proteína sinalizadora extracelular que estimula a divisão celular, liga-se primeiramente à porção heparan-sulfato das moléculas de sindecano da membrana plasmática da célula-alvo. O sindecano apresenta o FGF ao seu receptor da membrana celular, de modo que apenas assim o FGF consegue interagir produtivamente com seu receptor para ativar a divisão celular. Finalmente, em outro tipo de mecanismo, os domínios NS interagem – eletrostaticamente e de outras maneiras – com diversas moléculas extracelulares solúveis, mantendo altas concentrações dessas moléculas na superfície celular (Figura 7-27d).

A importância de domínios sulfatados corretamente sintetizados no heparan-sulfato é demonstrada no camundongo mutante ("nocaute") que carece da enzima que sulfata a hidroxila do C-2 do iduronato (IdoA). Esses animais nascem sem os rins e com anormalidades muito graves no desenvolvimento do esqueleto e dos olhos. Outros estudos

**(a) Ativação conformacional**

Uma mudança conformacional induzida na proteína antitrombina (AT) após sua ligação a um pentassacarídeo específico no domínio NS permite a interação de AT com o fator Xa da coagulação sanguínea, impedindo a coagulação.

**(b) Intensificação da interação proteína-proteína**

A ligação de AT e trombina a dois domínios NS adjacentes aproxima as duas proteínas e favorece sua interação, o que inibe a coagulação sanguínea.

**(c) Correceptor para ligantes extracelulares**

Os domínios NS interagem tanto com o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) quanto com seu receptor, unindo o complexo oligomérico e aumentando a eficácia de baixas concentrações de FGF.

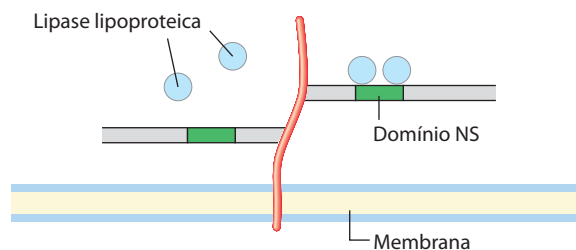
**(d) Localização/concentração na superfície celular**

A alta densidade de cargas negativas do heparan-sulfato atrai as moléculas de lipase lipoproteica positivamente carregadas e as retém por meio de interações eletrostáticas e interações de sequência específicas destas com os domínios NS.

**FIGURA 7-27** **Quatro tipos de proteínas que interagem com os domínios NS do heparan-sulfato.**

mostram que proteoglicanos de membrana são importantes para a depuração de lipoproteínas no fígado. Existem evidências crescentes que a rota escolhida pelos axônios em desenvolvimento no sistema nervoso – o circuito neuronal – é influenciada por proteoglicanos contendo heparan-sulfato e sulfato de condroitina, os quais fornecem indicações direcionais para o crescimento do axônio.

Alguns proteoglicanos podem formar **agregados proteoglicanos**, enormes grupos supramoleculares de muitas proteínas centrais, todas ligadas a uma única molécula de ácido hialurônico. A proteína central agrecana ($M_r$ ~250.000) tem múltiplas cadeias de sulfato de condroitina e queratan-sulfato unidas a resíduos de Ser da proteína central por meio de ligações trissacarídicas, gerando um monômero de agrecano com $M_r$ ~$2 \times 10^6$. Quando centenas ou mais dessas proteínas centrais "decoradas" se ligam a uma única molécula estendida de hialuronato (**Figura 7-28**), o agregado proteoglicano resultante ($M_r > 2 \times 10^8$) e a água de hidratação associada ocupam aproximadamente o mesmo volume de uma célula bacteriana! O agrecano interage fortemente com o colágeno da matriz extracelular das cartilagens, contribuindo para o desenvolvimento, a resistência à tensão e a elasticidade desse tecido conectivo.

Entrelaçadas com esses enormes proteoglicanos extracelulares estão as proteínas fibrosas da matriz, como colágeno, elastina e fibronectina, formando uma rede de ligações cruzadas que garantem força e elasticidade à toda a matriz extracelular. Algumas dessas proteínas são multiadesivas, uma única proteína possui sítios de ligação para diferentes moléculas da matriz. A fibronectina, por exemplo, tem domínios separados que ligam fibrina, heparan-sulfato, colágeno e uma família de proteínas da membrana plasmática chamadas de integrinas, que controlam a sinalização entre o interior celular e a matriz extracelular (ver Figura 12-29). O quadro geral de interações célula-matriz que emerge (**Figura 7-29**) mostra um arranjo de interações entre moléculas celulares e extracelulares. Essas interações não servem meramente para a ancoragem das células à matriz extracelular, mas também proveem rotas que guiam a migração celular nos tecidos em desenvolvimento e propagam informações em ambas as direções através da membrana plasmática.

**FIGURA 7-29 Interações entre as células e a matriz extracelular.** A associação entre as células e os proteoglicanos da matriz extracelular é mediada por uma proteína de membrana (integrina) e por uma proteína extracelular (fibronectina, neste exemplo) que tem sítios de ligação tanto para integrina quanto para proteoglicano. Observe a proximidade na associação das fibras de colágeno com a fibronectina e o proteoglicano.

**FIGURA 7-28 Agregado proteoglicano da matriz extracelular.** Desenho esquemático de um proteoglicano com muitas moléculas de agrecano. Uma molécula muito longa de ácido hialurônico está associada não covalentemente com cerca de 100 moléculas da proteína central agrecano. Cada molécula de agrecano contém muitas cadeias de sulfato de condroitina e queratan-sulfato ligadas covalentemente. Proteínas de ligação nas junções entre cada proteína central e o esqueleto do ácido hialurônico controlam a interação proteína central-ácido hialurônico. A micrografia mostra uma única molécula de agrecano, visualizada com um microscópio de força atômica (ver Quadro 19-2).

## Glicoproteínas têm oligossacarídeos ligados covalentemente

Glicoproteínas são conjugados carboidrato-proteína nos quais os glicanos são menores, ramificados e mais estruturalmente diversos do que os gigantescos glicosaminoglicanos dos proteoglicanos. O carboidrato é ligado por meio de seu carbono anomérico por uma ligação glicosídica com o –OH de um resíduo de Ser ou Thr (*O*-ligado) ou por uma ligação *N*-glicosil com o nitrogênio da amida de um resíduo de Asn (*N*-ligado) (**Figura 7-30**). Algumas glicoproteínas têm uma única cadeia de oligossacarídeo, porém muitas têm mais de uma; o carboidrato pode constituir de 1 a 70% ou mais da massa da glicoproteína. Aproximadamente metade de todas as proteínas de mamíferos é glicosilada, e cerca de 1% de todos os genes de mamíferos codifica para enzimas envolvidas na síntese e na ligação dessas cadeias de oligossacarídeos. Oligossacarídeos *N*-ligados são geral-

mente encontrados na sequência de consenso N-{P}-[ST]; nem todos os sítios potenciais são utilizados. (Consulte o Quadro 3-2 para convenções da representação de sequências de consenso). Aparentemente, não existe uma sequência consenso específica para os oligossacarídeos *O*-ligados, embora as regiões apresentando cadeias *O*-ligadas tendam a ser ricas em resíduos de Gly, Val e Pro.

Uma classe peculiar de glicoproteínas é encontrada no citoplasma e no núcleo; nessas proteínas, as posições glicosiladas contêm somente resíduos únicos de *N*-acetilglicosamina em ligações *O*-glicosídicas com o grupo hidroxila das cadeias laterais de Ser. Essa modificação é reversível e ocorre frequentemente nos mesmos resíduos de Ser que serão fosforilados em algum estágio da atividade proteica. As duas modificações são mutuamente exclusivas e este tipo de glicosilação é importante para a regulação da atividade das proteínas. Discute-se a fosforilação de proteínas amplamente no Capítulo 12.

Como será visto no Capítulo 11, a superfície externa da membrana plasmática tem muitas glicoproteínas de membrana, as quais contêm arranjos de oligossacarídeos covalentemente ligados de complexidade variada. As **mucinas** são glicoproteínas de membrana ou secretadas que podem conter grandes números de cadeias de oligossacarídeos *O*-ligadas. Estão presentes na maioria das secreções, sendo responsáveis pela característica escorregadia do muco.

**FIGURA 7-30 Ligação de oligossacarídeos a glicoproteínas. (a)** Os oligossacarídeos *O*-ligados formam uma ligação glicosídica com o grupo hidroxila de resíduos de Ser ou Thr (em vermelho); a ligação ilustrada aqui apresenta GalNAc como o açúcar da extremidade redutora do oligossacarídeo. Uma cadeia simples e uma cadeia complexa estão mostradas. **(b)** Os oligossacarídeos *N*-ligados formam uma ligação *N*-glicosil com o nitrogênio da amida de um resíduo de Asn (em verde); a ligação ilustrada aqui tem GlcNAc como o açúcar terminal. Três tipos comuns de cadeias de oligossacarídeos *N*-ligadas em glicoproteínas estão mostrados. Uma descrição completa da estrutura do oligossacarídeo requer a especificação da posição e da estereoquímica ($\alpha$ ou $\beta$) de cada ligação glicosídica.

A caracterização sistemática de todos os carboidratos componentes de uma determinada célula ou tecido, incluindo aqueles ligados a proteínas ou lipídeos, é chamada de **glicômica**. Para as glicoproteínas, isso também significa determinar quais proteínas são glicosiladas e onde, na sequência de aminoácidos, cada oligossacarídeo está ligado. É um trabalho desafiador, mas valoroso pelo potencial da compreensão dos padrões normais de glicosilação e das formas nas quais eles podem ser alterados durante o desenvolvimento, em doenças genéticas ou em câncer. Os métodos atuais para a caracterização da totalidade dos carboidratos das células dependem muito de aplicações sofisticadas de espectrometria de massas (ver Figura 7-39).

As estruturas de um grande número de oligossacarídeos *O* e *N*-ligados de diversas glicoproteínas são conhecidas; as Figuras 7-24 e 7-30 apresentam alguns exemplos típicos. Serão discutidos os mecanismos por meio dos quais proteínas específicas adquirem porções oligossacarídicas no Capítulo 27.

Muitas das proteínas secretadas por células eucarióticas são glicoproteínas, incluindo a maioria das proteínas do sangue. Por exemplo, as imunoglobulinas (anticorpos) e certos hormônios, como o hormônio folículo-estimulante, o hormônio luteinizante e o hormônio estimulante da tireoide, são glicoproteínas. Muitas proteínas do leite, incluindo a principal proteína do soro do leite, $\alpha$-lactalbumina, e algumas das proteínas secretadas pelo pâncreas, como a ribonuclease, são glicosiladas, assim como a maioria das proteínas contidas nos lisossomos.

Aos poucos, as vantagens biológicas da adição de oligossacarídeos a proteínas estão sendo descobertas. Os agrupamentos altamente hidrofílicos de carboidratos alteram a polaridade e a solubilidade das proteínas com as quais estão conjugados. Cadeias de oligossacarídeos ligadas a proteínas que foram recentemente sintetizadas no retículo endoplasmático (RE) e trabalhadas no aparelho de Golgi servem como marcadores do destino da proteína (ver Figura 27-39) e também para o controle da qualidade proteica, marcando proteínas mal dobradas para a degradação (ver Figura 27-40). Quando numerosas cadeias de oligossacarídeos negativamente carregadas se agrupam em uma única região de uma proteína, a repulsão de cargas entre elas favorece a formação de uma estrutura estendida, em forma de bastão, naquela região. O volume e a carga negativa das cadeias de oligossacarídeos também protegem algumas proteínas do ataque por enzimas proteolíticas. Além desses efeitos físicos gerais sobre a estrutura das proteínas, também existem efeitos biológicos específicos induzidos pelas cadeias de oligossacarídeos em glicoproteínas (Seção 7.4). A importância da glicosilação em proteínas torna-se evidente com a descoberta de pelo menos 18 diferentes distúrbios genéticos que afetam a glicosilação em humanos. Todos esses distúrbios causam graves problemas no desenvolvimento físico ou mental, sendo às vezes fatal para o indivíduo.

**FIGURA 7-31 Lipopolissacarídeos bacterianos.** Diagrama esquemático do lipopolissacarídeo da membrana externa de *Salmonella typhimurium*. Kdo é o ácido 3-desóxi-D-*mano*-octulosônico (antes chamado de ácido cetodesóxi-octônico); Hep é L-*glicero*-D-*mano*-heptose; AbeOAc é abequose (uma 3,6-didesóxi-hexose) acetilada em uma de suas hidroxilas. Existem seis resíduos de ácidos graxos na porção lipídeo A da molécula. Diferentes espécies bacterianas têm estruturas de lipopolissacarídeos sutilmente diferentes, embora tenham em comum uma região lipídica (lipídeo A), também conhecida como endotoxina, oligossacarídeo central e uma cadeia "*O*-específica", o principal determinante do sorotipo (reatividade imunológica) da bactéria. As membranas externas das bactérias gram-negativas *S. typhimurium* e *E. coli* contêm tantas moléculas de lipopolissacarídeos que a superfície celular é praticamente coberta com cadeias *O*-específicas.

## Glicolipídeos e lipopolissacarídeos são componentes de membranas

As glicoproteínas não são os únicos componentes celulares que exibem cadeias de oligossacarídeos; alguns lipídeos também têm oligossacarídeos covalentemente ligados. Os **gangliosídeos** são lipídeos de membrana das células eucarióticas nos quais o grupo polar, a parte do lipídeo que forma a superfície externa da membrana, é um oligossacarídeo complexo contendo ácido siálico (Figura 7-9) e outros resíduos de monossacarídeos. Algumas das porções oligossacarídicas dos gangliosídeos, como aquelas que determinam os grupos sanguíneos humanos (ver Figura 10-15), são idênticas àquelas encontradas em certas glicoproteínas, as quais, portanto, também contribuem para o tipo do grupo sanguíneo. Assim como as porções oligossacarídicas das glicoproteínas, aquelas dos lipídeos de membrana são encontradas comumente, talvez sempre, na superfície externa da membrana plasmática.

**Lipopolissacarídeos** são as moléculas dominantes da superfície da membrana externa de bactérias gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. Essas moléculas são o alvo primordial dos anticorpos produzidos pelo sistema imune dos vertebrados em resposta a uma infecção bacteriana e, por essa razão, são importantes na determinação dos sorotipos das linhagens bacterianas (sorotipos são linhagens distintas pelas propriedades antigênicas). Os lipopolissacarídeos de *S. typhimurium* contêm seis ácidos graxos ligados a dois resíduos de glicosamina, um dos quais é o ponto de ligação para um oligossacarídeo complexo (**Figura 7-31**). *E. coli* tem lipopolissacarídeos similares, porém exclusivos. A porção lipídeo A dos lipopolissacarídeos de algumas bactérias é chamada de endotoxina; sua toxicidade para humanos e outros animais é responsável pela pressão sanguínea perigosamente baixa que ocorre na síndrome do choque tóxico resultante de infecções por bactérias gram-negativas. ■

## RESUMO 7.3 Glicoconjugados: proteoglicanos, glicoproteínas e glicoesfingolipídeos

- Os proteoglicanos são glicoconjugados nos quais um ou mais glicanos grandes, chamados de glicosaminoglicanos sulfatados (heparan-sulfato, sulfato de condroitina, dermatan-sulfato ou queratan-sulfato) estão covalentemente ligados a uma proteína central. Unidos à superfície externa da membrana plasmática por meio de um peptídeo transmembrana ou um lipídeo ligado covalentemente, os proteoglicanos fornecem pontos de adesão, reconhecimento e transferência de informação entre as células ou entre as células e a matriz extracelular.
- As glicoproteínas contêm oligossacarídeos covalentemente ligados a resíduos de Asp ou Ser/Thr. Em geral,

os glicanos são ramificados e menores do que os glicosaminoglicanos. Muitas proteínas extracelulares ou da superfície celular são glicoproteínas, assim como a maioria das proteínas secretadas. Os oligossacarídeos covalentemente ligados influenciam o enovelamento e a estabilidade das proteínas, fornecem informações cruciais sobre o destino de proteínas recentemente sintetizadas e permitem o reconhecimento específico por outras proteínas.

- A glicômica é a determinação da totalidade das moléculas contendo açúcar em uma célula ou tecido, assim como a determinação da função de cada uma dessas moléculas.
- Glicolipídeos e glicoesfingolipídeos em plantas e animais e lipopolissacarídeos em bactérias são componentes do envelope celular com cadeias de oligossacarídeos expostas na superfície externa da célula.

## 7.4 Carboidratos como moléculas informativas: o código dos açúcares

A glicobiologia, o estudo da estrutura e da função de glicoconjugados, é uma das mais ativas e excitantes áreas da bioquímica e da biologia celular. Cada vez fica mais claro que as células utilizam oligossacarídeos específicos para codificar importantes informações sobre o destino de proteínas, as interações célula-célula, a diferenciação celular e o desenvolvimento de tecidos, além de os utilizarem como sinais extracelulares. A presente discussão utiliza somente alguns exemplos para ilustrar a diversidade de estruturas e o alcance de atividades biológicas dos glicoconjugados. No Capítulo 20, será discutida a biossíntese de polissacarídeos, incluindo os peptidoglicanos, e no Capítulo 27, a associação de cadeias de oligossacarídeos a glicoproteínas.

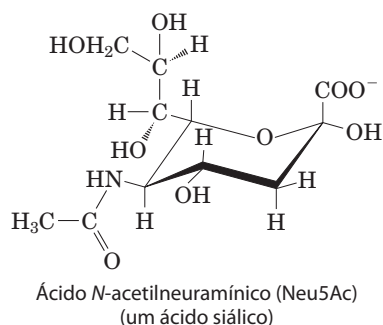
O aprimoramento dos métodos para a análise da estrutura de oligossacarídeos e polissacarídeos tem revelado a extraordinária complexidade e diversidade dos oligossacarídeos de glicoproteínas e glicolipídeos. Considere as cadeias de oligossacarídeos da Figura 7-30, típicas daquelas encontradas em muitas glicoproteínas. A mais complexa delas contém 14 resíduos de monossacarídeos de quatro tipos diferentes, variadamente ligados como ($1\rightarrow2$), ($1\rightarrow3$), ($1\rightarrow4$), ($1\rightarrow6$), ($2\rightarrow3$) e ($2\rightarrow6$), alguns com configuração $\alpha$ e alguns com configuração $\beta$. Estruturas ramificadas, não encontradas em ácidos nucleicos ou proteínas, são comuns em oligossacarídeos. Com a suposição razoável de que 20 subunidades de monossacarídeos diferentes estão disponíveis para a construção de oligossacarídeos, estima-se que muitos bilhões de oligossacarídeos hexaméricos diferentes sejam possíveis; isso se compara com $6{,}4 \times 10^7$ ($20^6$) diferentes hexapeptídeos possíveis com os 20 aminoácidos comuns, e 4.096 ($4^6$) diferentes hexanucleotídeos possíveis com as quatro subunidades nucleotídicas. Se permitirmos também as variações em oligossacarídeos resultantes da sulfatação de um ou mais dos resíduos, o número de oligossacarídeos possíveis aumenta em duas ordens de magnitude. Na realidade, apenas um subconjunto das possíveis combinações é encontrado, devido às restrições impostas por enzimas biossintéticas e disponibilidade de precursores. Ainda assim, a enorme riqueza de informações na estrutura dos glicanos não somente compete com a dos ácidos nucleicos na densidade de informações contidas em uma molécula de tamanho modesto, mas também a supera em muito. Cada um dos oligossacarídeos representados nas Figuras 7-24 e 7-30 têm configuração tridimensional única – uma palavra no código dos açúcares – e legível para as proteínas com as quais eles interagem.

### Lectinas são proteínas que leem o código dos açúcares e controlam muitos processos biológicos

As **lectinas**, encontradas em todos os organismos, são proteínas que ligam carboidratos com alta especificidade e com moderada a alta afinidade. Participam de vários processos de reconhecimento celular, sinalização e adesão e na destinação intracelular de proteínas recentemente sintetizadas. As lectinas de plantas, abundantes em sementes, provavelmente atuam como restringentes para insetos e outros predadores. No laboratório, lectinas vegetais purificadas são reagentes úteis para a detecção e a separação de glicanos e glicoproteínas ligados a diferentes oligossacarídeos. Aqui, serão discutidos apenas alguns exemplos dos papéis das lectinas em células animais.

Alguns hormônios peptídicos que circulam no sangue estão ligados a oligossacarídeos que influenciam fortemente suas meias-vidas na circulação. Os hormônios luteinizante e tireotropina (hormônios peptídicos produzidos na hipófise) têm oligossacarídeos *N*-ligados que terminam com o dissacarídeo GalNAc4S($\beta1\rightarrow4$)GlcNAc, reconhecido por uma lectina (receptor) em hepatócitos. (GalNAc4S é uma *N*-acetilgalactosamina sulfatada no grupo —OH do C-4.) A interação receptor-hormônio é responsável por mediar a internalização e a destruição dos hormônios luteinizante e tireotropina, reduzindo suas concentrações no sangue. Consequentemente, os níveis sanguíneos desses hormônios passam por periódicas ascensões (devidas à secreção pulsátil pela hipófise) e quedas (devidas à destruição contínua pelos hepatócitos).

Os resíduos de Neu5Ac (um ácido siálico) situados nas extremidades das cadeias de oligossacarídeos de muitas glicoproteínas do plasma (Figura 7-24) protegem essas proteínas da captação e da degradação no fígado. Por exemplo, a ceruloplasmina, glicoproteína sérica que contém cobre, tem algumas cadeias de oligossacarídeo terminando com Neu5Ac. O mecanismo que remove os resíduos de ácido siálico de glicoproteínas séricas não está claro. A remoção pode ser causada pela atividade da enzima neuraminidase (também chamada desialidase) produzida por organismos invasores ou pela remoção lenta e constante por enzimas extracelulares. A membrana plasmática dos hepatócitos possui moléculas de lectinas (receptoras para assialoglicoproteínas; "assialo" significando "sem ácido siálico") que se ligam especificamente a cadeias de oligossacarídeos com resíduos de galactose não mais "protegidos" por um resíduo terminal de Neu5Ac. A interação receptor-ceruloplasmina desencadeia a endocitose e a destruição de ceruloplasmina.

Ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac)
(um ácido siálico)

Um mecanismo similar é aparentemente responsável pela remoção de eritrócitos "velhos" da corrente sanguínea em mamíferos. Eritrócitos sintetizados recentemente têm algumas glicoproteínas de membrana com cadeias de oligossacarídeos que terminam em Neu5Ac. Quando os resíduos de ácido siálico são removidos – coletando-se uma amostra de sangue de cobaias, tratando-a com neuraminidase *in vitro* e reintroduzindo-a na circulação –, os eritrócitos tratados desaparecem da circulação em poucas horas; eritrócitos com oligossacarídeos intactos (coletados e reintroduzidos, sem tratamento com neuraminidase) continuam a circular por dias.

Lectinas da superfície celular são importantes no desenvolvimento de algumas doenças humanas – tanto as lectinas humanas quanto aquelas dos agentes infecciosos. As **selectinas** compõem uma família de lectinas da membrana plasmática que controlam o reconhecimento e a adesão célula-célula em diversos processos celulares. Um desses processos é o movimento das células do sistema imune (leucócitos) através da parede dos capilares, do sangue para os tecidos, em sítios de infecção ou inflamação (**Figura 7-32**). Em um sítio de infecção, a selectina-P da superfície das células endoteliais dos capilares interage com um oligossacarídeo específico das glicoproteínas da superfície dos leucócitos circulantes. Essa interação desacelera os leucócitos, que rolam sobre o revestimento endotelial dos capilares. Uma segunda interação, entre moléculas de integrina (p. 470) da membrana plasmática dos leucócitos e uma proteína de adesão da superfície das células endoteliais, detém o leucócito e permite que ele atravesse a parede do capilar, entrando nos tecidos infectados para iniciar o ataque imune. Duas outras selectinas participam dessa "migração dos linfócitos": a selectina-E da célula endotelial e a selectina-L do leucócito ligam-se aos oligossacarídeos correspondentes em leucócitos e células endoteliais, respectivamente.

Como as selectinas de humanos controlam as respostas inflamatórias na artrite reumatoide, asma, psoríase, esclerose múltipla e rejeição de órgãos transplantados, existe um grande interesse no desenvolvimento de fármacos que inibam a adesão celular mediada por selectinas. Muitos carcinomas expressam um antígeno normalmente presente apenas em células fetais (sialil Lewis x ou sialil $Le^x$), o qual, quando liberado na circulação, facilita a sobrevivência e a metástase das células tumorais. Derivados de carboidratos que mimetizam a porção sialil $Le^x$ de sialoglicoproteínas ou que alteram a biossíntese deste oligossacarídeo podem tornar-se fármacos específicos para selectinas eficazes no tratamento de inflamações crônicas ou doenças metastáticas.

Alguns vírus que infectam animais, incluindo o vírus influenza, aderem às células hospedeiras por meio de interações com os oligossacarídeos apresentados na superfície dessas células. A lectina do vírus influenza, conhecida como proteína HA (hemaglutinina), é essencial para a entrada e a infecção viral. Após a entrada e a replicação do vírus em uma célula hospedeira, as partículas virais sintetizadas recentemente deixam a célula hospedeira envolvidas em uma porção da membrana plasmática. Uma sialidase (neurami-

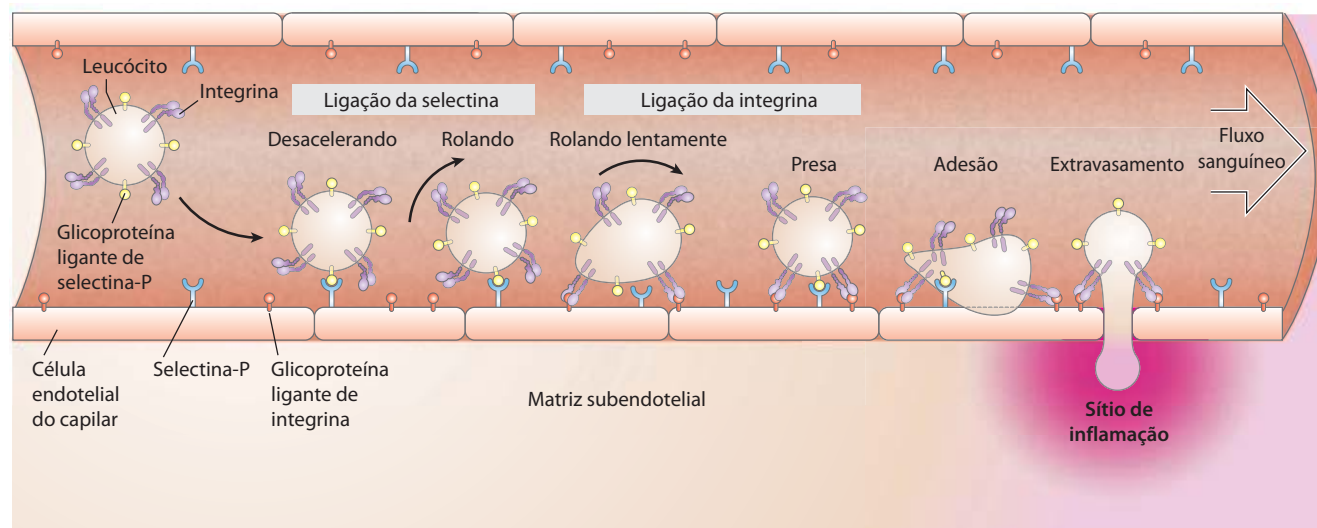



**FIGURA 7-32 Função das interações lectina-ligante durante a movimentação de leucócitos para um sítio de infecção ou ferimento.** Um leucócito movendo-se ao longo de um capilar é desacelerado por interações transitórias entre moléculas de selectina-P da membrana plasmática das células endoteliais do capilar e glicoproteínas ligantes de selectina-P da superfície do leucócito. Por interagir com moléculas de selectina-P consecutivas, o leucócito rola sobre a superfície do capilar. Próximo a um sítio de inflamação, interações mais fortes entre integrinas da superfície do leucócito e seus ligantes na superfície do capilar levam a uma adesão firme. O leucócito para de rolar e, sob a influência de sinais enviados a partir do sítio de inflamação, começa a extravasar – escapar através da parede do capilar –, movendo-se em direção ao sítio de inflamação.

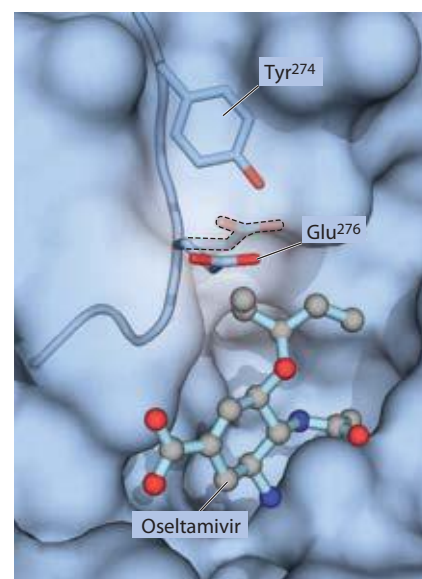
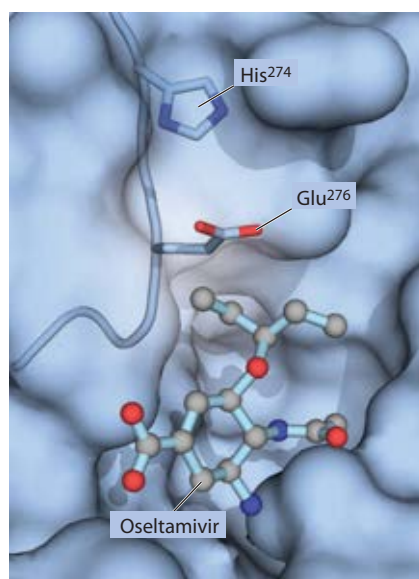
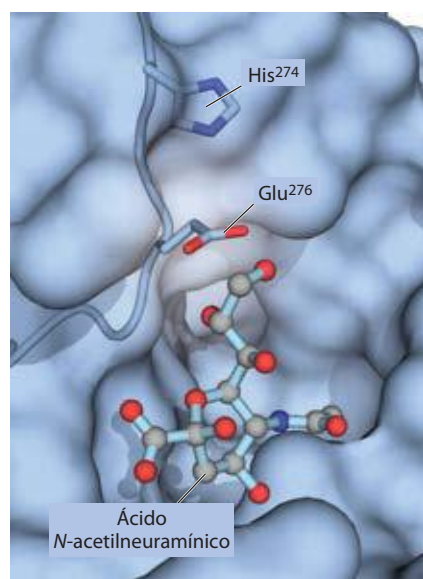
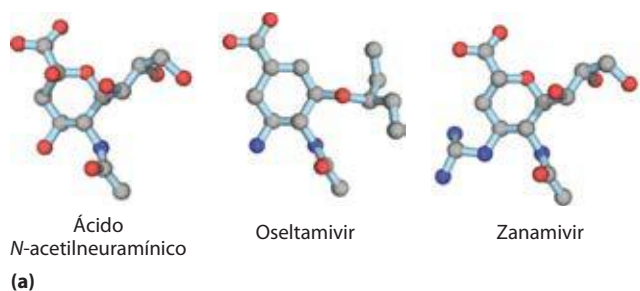



**FIGURA 7-33 O sítio de ligação para o ácido *N*-acetilneuramínico e para o fármaco antiviral oseltamivir na neuraminidase do influenza.** **(a)** O ligante normal desta enzima é um ácido siálico, o ácido *N*-acetilneuramínico. Os fármacos oseltamivir e zanamivir ocupam o mesmo sítio da enzima, competitivamente inibindo-a e bloqueando a liberação do vírus pela célula hospedeira. **(b)** A interação normal com o ácido *N*-acetilneuramínico no sítio de ligação (PDB ID 2BAT). **(c)** O oseltamivir consegue encaixar-se neste sítio empurrando um resíduo de Glu para fora (PDB ID 2HU4). **(d)** Uma mutação no gene da neuraminidase do vírus influenza troca uma His próxima a este resíduo de Glu pela cadeia lateral maior de uma Tyr (PDB ID 3CL0). Agora, o oseltamivir não consegue empurrar o resíduo de Glu de maneira tão eficaz, e liga-se muito menos de maneira eficiente ao sítio de ligação, o que torna o vírus mutante efetivamente resistente ao oseltamivir.

nidase) viral remove o resíduo de ácido siálico terminal dos oligossacarídeos da célula hospedeira, liberando as partículas virais da interação com a célula e evitando a agregação de uma partícula com a outra. Outro ciclo de infecção pode, então, começar. Os fármacos antivirais oseltamivir (Tamiflu) e zanamivir (Relenza), utilizados clinicamente no tratamento do influenza, são análogos de açúcar e inibem a sialidase viral por competirem com os oligossacarídeos da célula hospedeira pela ligação à sialidase (**Figura 7-33**). Isso impede a liberação do vírus da célula infectada e também causa a agregação das partículas virais, efeitos que evitam um novo ciclo de infecção.

Alguns patógenos microbianos têm lectinas que controlam a adesão bacteriana às células hospedeiras ou a entrada de toxinas para dentro das células. Por exemplo, a bactéria *Helicobacter pylori* tem uma lectina em sua superfície que adere a oligossacarídeos da superfície das células do epitélio que revestem a superfície interna do estômago (**Figura 7-34**). Entre os sítios de ligação reconhecidos pela lectina da *H. pylori* está o oligossacarídeo Lewis b ($Le^b$), presente nas glicoproteínas e glicolipídeos que definem o determinante do grupo sanguíneo do tipo O (ver Figura 10-15). Essa observação ajuda a explicar o grau algumas vezes maior de incidência de úlceras gástricas em pessoas

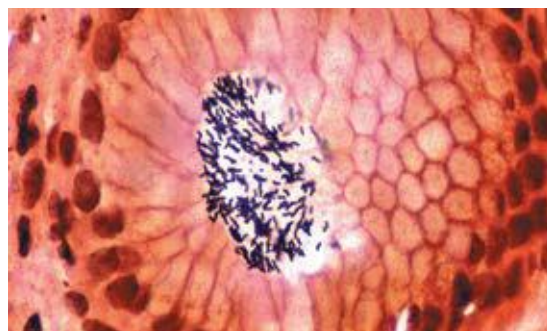



**FIGURA 7-34 O desenvolvimento de uma úlcera.** Células de *Helicobacter pylori* se aderindo à superfície gástrica. Essa bactéria causa úlceras por meio das interações entre uma lectina da superfície bacteriana e o oligossacarídeo $Le^b$ (antígeno de grupo sanguíneo) das células epiteliais que revestem a superfície interna do estômago.

do tipo sanguíneo O do que naquelas do tipo A ou B; a *H. pylori* ataca as células epiteliais dessas pessoas de maneira mais eficiente. Análogos de oligossacarídeo $Le^b$ podem mostrar-se úteis para o tratamento desse tipo de úlcera. Administrados oralmente, eles poderiam prevenir a adesão bacteriana (e, portanto, a infecção) por competirem com as glicoproteínas gástricas pela ligação à lectina bacteriana.

Algumas das mais devastadoras doenças parasitárias humanas, disseminadas em grande parte dos países em desenvolvimento, são causadas por microrganismos eucarióticos que apresentam na superfície oligossacarídeos incomuns, que em alguns casos protegem os parasitas. Entre esses organismos estão os tripanossomos, responsáveis pela doença do sono africana e a doença de Chagas (ver Quadro 6-3); *Plasmodium falciparum*, o parasita da malária; e *Entamoeba histolytica*, o agente causador da disenteria ameboide. A expectativa do descobrimento de fármacos que interfiram com a síntese das cadeias desses oligossacarídeos incomuns e, dessa maneira, com a replicação dos parasitas, tem recentemente inspirado muitos trabalhos sobre as rotas de biossíntese destes oligossacarídeos. ■

As lectinas também agem intracelularmente, endereçando proteínas para seu transporte a localizações celulares específicas (ver Capítulo 27). Por exemplo, um oligossacarídeo contendo manose-6-fosfato, reconhecido por uma lectina, marca proteínas recém-sintetizadas no aparelho de Golgi para sua transferência ao lisossomo (ver Figura 27-39).

## As interações lectina-carboidrato são altamente específicas e frequentemente multivalentes

A alta densidade de informações contida na estrutura dos oligossacarídeos proporciona um código de açúcares com um número ilimitado de "palavras", pequenas o suficiente para serem lidas por uma única proteína. Nos sítios de ligação a carboidratos, as lectinas têm uma requintada complementaridade molecular que permite a interação somente com os carboidratos correspondentes corretos. O resultado é uma especificidade extremamente alta nessas interações. A afinidade entre um oligossacarídeo e um domínio individual de ligação a carboidratos (DLC) de uma lectina é, algumas vezes, modesta (valores de $K_d$ entre micromolar e milimolar), mas a afinidade real é, em muitos casos, notavelmente aumentada pela multivalência da lectina, na qual uma única molécula de lectina tem múltiplos DLC. Em um agrupamento de oligossacarídeos – como comumente encontrado em uma superfície de membrana, por exemplo –, cada oligossacarídeo pode ocupar um dos DLC da lectina, fortalecendo a interação. Quando as células expressam múltiplas lectinas, a força da interação pode ser muito alta, possibilitando eventos altamente cooperativos, como a adesão e o rolamento da célula (Figura 7-32).

Estudos cristalográficos por raios X da estrutura da lectina receptora de manose-6-fosfato revelam detalhes de sua interação com a manose-6-fosfato que explicam a especificidade da ligação e a função de um cátion divalente na interação lectina-açúcar (**Figura 7-35a**). A $His^{105}$ está formando ligações de hidrogênio com um dos átomos de oxigênio do fosfato (Figura 7-35b). Quando a proteína marcada com manose-6-fosfato chega ao lisossomo (que tem um pH interno menor do que o do complexo de Golgi), o receptor perde a afinidade pela manose-6-fosfato. A protonação da $His^{105}$ pode ser responsável por esta alteração na ligação.

Além dessas interações extremamente específicas, existem interações mais gerais que também contribuem para a ligação de muitos carboidratos às respectivas lectinas. Por exemplo, muitos açúcares têm um lado mais polar e um

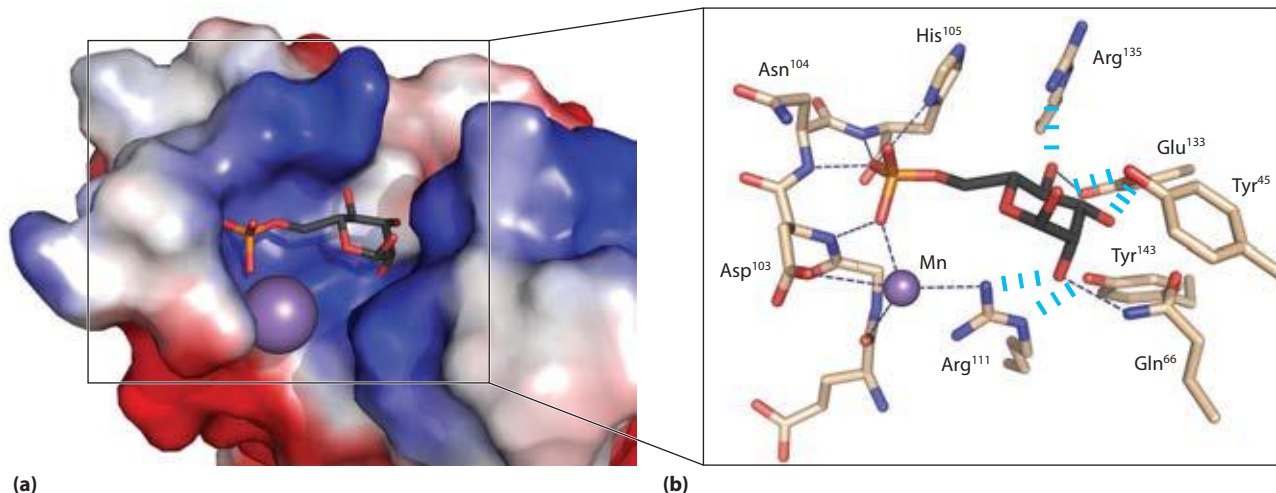



**FIGURA 7-35 Detalhes de uma interação lectina-carboidrato. (a)** Estrutura do receptor de manose-6-fosfato bovino em complexo com manose-6-fosfato (PDB ID 1M6P). A proteína está representada pela imagem de contorno da superfície, mostrando a superfície com predominância de carga negativa (em vermelho) ou positiva (em azul). A manose-6-fosfato está representada por uma estrutura em bastão; um íon manganês está representado por uma esfera violeta. **(b)** Uma visão ampliada do sítio de ligação. A manose-6-fosfato é unida por ligações de hidrogênio à $Arg^{111}$ e coordenada ao íon manganês (mostrado com o menor raio de van der Waals para maior clareza). Cada grupo hidroxila da manose é unido à proteína por meio de ligações de hidrogênio. A $His^{105}$, que forma ligações de hidrogênio com o oxigênio do fosfato da manose, pode ser o resíduo que, quando protonado em baixo pH, induz o receptor a liberar a manose-6-fosfato dentro do lisossomo.

lado menos polar (**Figura 7-36**); o lado mais polar forma ligações de hidrogênio com a lectina, enquanto o lado menos polar forma interações hidrofóbicas com resíduos de aminoácidos apolares. A soma de todas estas interações produz uma ligação de alta afinidade e garante a alta especificidade das lectinas a seus carboidratos. A interação lectina-carboidrato constitui um modo de transferência de informação que é absolutamente central em muitos processos dentro e entre células. A **Figura 7-37** resume algumas das interações biológicas mediadas pelo código dos açúcares.

**FIGURA 7-36 Interações hidrofóbicas dos resíduos de açúcar.** Unidades de açúcar, como a galactose, têm um lado mais polar (o topo da cadeira mostrada aqui, com o oxigênio do anel e algumas hidroxilas), disponível para a formação de ligações de hidrogênio com a lectina, e um lado menos polar, que pode formar interações hidrofóbicas com cadeias laterais apolares da proteína, como o anel indol de resíduos de Trp.

## RESUMO 7.4 Carboidratos como moléculas informativas: o código dos açúcares

- Os monossacarídeos podem ser organizados em uma variedade quase ilimitada de oligossacarídeos, os quais diferem na estereoquímica e na posição das ligações glicosídicas, no tipo de orientação dos grupos substituintes e no número e no tipo de ramificações. Os glicanos contêm muito mais densidade de informação do que os ácidos nucleicos ou as proteínas.
- As lectinas (proteínas com domínios de ligação a carboidratos com especificidade alta) são comumente encontradas na superfície externa das células, onde iniciam interações com outras células. Em vertebrados, oligossacarídeos marcados "lidos" por lectinas determinam a taxa de degradação de certos hormônios peptídicos, proteínas da circulação e células sanguíneas.
- Patógenos bacterianos e virais, e alguns parasitas eucarióticos, aderem-se às células-alvo animais por meio da ligação de lectinas dos patógenos a oligossacarídeos da superfície da célula-alvo.
- A cristalografia por raios X de complexos lectina-açúcar mostra a requintada complementaridade entre as duas moléculas, o que garante a força e a especificidade das interações de lectinas com carboidratos.

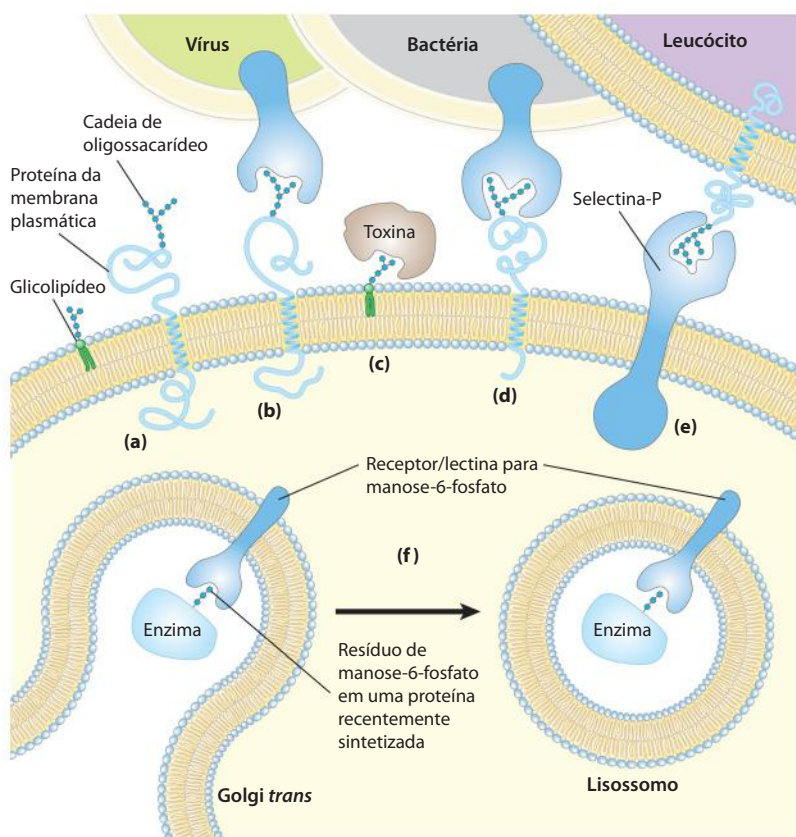



**FIGURA 7-37 Funções dos oligossacarídeos nos eventos de reconhecimento na superfície celular e nos sistemas de endomembranas. (a)** Os oligossacarídeos com estruturas únicas (representados como correntes de hexágonos) são componentes de várias glicoproteínas ou glicolipídeos na superfície externa de membranas plasmáticas. Seus oligossacarídeos se ligam a lectinas do meio extracelular com alta especificidade e alta afinidade. **(b)** Vírus que infectam células animais, como o influenza, ligam-se a glicoproteínas da superfície celular na primeira etapa da infecção. **(c)** Toxinas bacterianas, como as do cólera e da coqueluche, ligam-se a um glicolipídeo da superfície antes de entrarem na célula. **(d)** Algumas bactérias, como a *H. pylori*, aderem-e a células animais e, então, as colonizam ou infectam. **(e)** Selectinas (lectinas) da membrana plasmática de certas células controlam interações célula-célula, como aquelas dos leucócitos com as células endoteliais da parede capilar em um sítio de infecção. **(f)** O receptor/lectina para manose-6-fosfato do aparelho de Golgi *trans* se liga ao oligossacarídeo em enzimas lisossômicas, selecionando-as para transferência ao lisossomo.

## 7.5 Trabalhando com carboidratos

A crescente compreensão da importância da estrutura dos oligossacarídeos no reconhecimento e na sinalização biológicos tem sido a força motriz por trás do desenvolvimento de métodos para a análise da estrutura e da estereoquímica de oligossacarídeos complexos. A análise de oligossacarídeos é complicada, pois, ao contrário de ácidos nucleicos e proteínas, os oligossacarídeos podem ser ramificados e unidos por diferentes ligações. A alta densidade de cargas de muitos oligossacarídeos e polissacarídeos e a relativa instabilidade dos ésteres de sulfato nos glicosaminoglicanos causam ainda mais dificuldades.

Para polímeros simples, lineares, como a amilose, as posições das ligações glicosídicas são determinadas pelo clássico método de metilação exaustiva: o polímero intacto é tratado com iodeto de metil em meio fortemente básico para a conversão de todas as hidroxilas livres a ésteres de metil estáveis em ácido e, em seguida, o polissacarídeo metilado é hidrolisado em ácido. As únicas hidroxilas livres presentes nos monossacarídeos derivados dessa forma serão aquelas participantes das ligações glicosídicas. Para determinar a sequência dos resíduos de monossacarídeos, incluindo quaisquer ramificações que estejam presentes, exoglicosidases com especificidade conhecida são utilizadas para remover um resíduo de cada vez a partir da(s) extremidade(s) não redutora(s). A especificidade destas exoglicosidases muitas vezes possibilita a dedução da posição e da estereoquímica das ligações.

Para a análise das porções oligossacarídicas de glicoproteínas e glicolipídeos, os oligossacarídeos são liberados por enzimas purificadas – glicosidases, que clivam especificamente oligossacarídeos *O*-ligados ou *N*-ligados, ou lipases, que removem grupos da cabeça de lipídeos. Alternativamente, glicanos *O*-ligados podem ser liberados de glicoproteínas pelo tratamento com hidrazina.

As misturas de carboidratos resultantes são separadas em componentes individuais por vários métodos (**Figura 7-38**), incluindo as mesmas técnicas utilizadas para a separação de aminoácidos e proteínas: precipitação fracionada por solventes e cromatografias de troca iônica e exclusão por tamanho (ver Figura 3-17). Lectinas altamente purificadas, unidas por covalência a um suporte insolúvel, são comumente utilizadas em cromatografia por afinidade a carboidrato (ver Figura 3-17c).

A hidrólise de oligossacarídeos e polissacarídeos em ácido forte origina uma mistura de monossacarídeos, os quais podem ser identificados e quantificados por técnicas cromatográficas para obter a composição total do polímero.

Cada vez mais, a análise de oligossacarídeos baseia-se em espectrometria de massa e espectroscopia por RMN de alta resolução. A espectrometria de massa por dessorção e ionização a *laser* assistida por matriz (MALDI MS, de *matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*) e a espectrometria de massa em tandem (MS/MS), ambas descritas no Capítulo 3, são facilmente aplicadas a compostos polares, como os oligossacarídeos. A MALDI MS é um método muito sensível para a determinação da massa de um íon molecular (neste caso, a cadeia de oligossacarídeo inteira; **Figura 7-39**). A MS/MS revela a massa do íon molecular e de muitos de seus fragmentos, os quais geralmente são o resultado da clivagem das ligações glicosídicas. A análise exclusiva por RMN (ver Quadro 4-5), especialmente para oligossacarídeos de tamanho moderado, pode gerar muitas informações sobre sequência, posição de ligações e configuração de carbonos anoméricos. Por exemplo, a estrutura do segmento de heparina mostrado em modelo de volume atômico na Figura 7-22 foi obtida por espectroscopia por RMN. Procedimentos automatizados e instrumentos comerciais são utilizados para a determinação rotineira da estrutura de oligossacarídeos, mas o sequenciamento de oligossacarídeos ramificados unidos por mais de um tipo de ligação permanece uma tarefa muito mais árdua do que a determinação de sequências lineares de proteínas e ácidos nucleicos.

Outra ferramenta importante no trabalho com carboidratos é a síntese química, que tem se mostrado uma abordagem eficaz para a compreensão das funções biológicas de glicosaminoglicanos e oligossacarídeos. A química envolvida nessas sínteses é difícil, mas os químicos de carboidratos agora podem sintetizar segmentos curtos de praticamente qualquer glicosaminoglicano – com estereoquímica, comprimento de cadeia e padrão de sulfatação corretos – e oligossacarídeos significativamente mais complexos do que aqueles mostrados na Figura 7-30. A síntese de oligossacarídeos em fase sólida tem como base os mesmos princípios (e possui as mesmas vantagens) que a síntese de peptídeos (ver Figura 3-32), porém requer um conjunto de ferramentas únicas à química de carboidratos: grupamentos bloqueadores e grupamentos ativadores que permitem a síntese de ligações glicosídicas com o grupo hidroxila correto. Abordagens sintéticas desse tipo representam uma área de grande interesse hoje, já que é trabalhoso purificar oligossacarídeos específicos em quantidades adequadas a partir de fontes naturais.

**Microarranjos de oligossacarídeos** são utilizados para a identificação de proteínas com afinidade específica por determinados oligossacarídeos. O princípio é o mesmo dos microarranjos de DNA (Figuras 9-22 e 9-23), porém os problemas técnicos são mais desafiadores. Microgotículas de oligossacarídeos puros são aderidas a uma lâmina de vidro, e a lâmina é exposta a uma lectina em potencial (proteína ligadora de glicano) que tenha sido marcada com uma molécula fluorescente (**Figura 7-40**). Após a remoção de toda a proteína não adsorvida, a observação dos microarranjos com um microscópio de fluorescência identifica os oligossacarídeos que a lectina reconheceu, e a quantificação da fluorescência fornece uma estimativa da afinidade entre a lectina e o oligossacarídeo.

### RESUMO 7.5 Trabalhando com carboidratos

- O estabelecimento da estrutura completa de oligossacarídeos e polissacarídeos requer a determinação da sequência linear, das posições das ramificações, da configuração de cada unidade de monossacarídeo e das posições das ligações glicosídicas – um problema mais complexo do que a análise de proteínas e ácidos nucleicos.
- As estruturas de oligossacarídeos e polissacarídeos em geral são determinadas por uma combinação de métodos: a hidrólise enzimática específica para determinar

Glicoproteína ou glicolipídeo

Liberação dos oligossacarídeos com endoglicosidase

Mistura de oligossacarídeos

1) Cromatografia de troca iônica
2) Filtração em gel
3) Cromatografia de afinidade à lectina

Polissacarídeos purificados

Oligossacarídeos separados

Hidrólise com ácido forte

Metilação exaustiva com $CH_3I$, base forte

Hidrólise enzimática com glicosidases específicas

RMN e espectrometria de massas

Monossacarídeos

Carboidrato totalmente metilado

Oligossacarídeos menores

Cromatografia líquida de alto desempenho, ou derivatização e cromatografia gasosa--líquida

Hidrólise em ácido gera monossacarídeos metilados em cada —OH, com exceção daqueles participantes de ligações glicosídicas

Separação dos fragmentos na mistura

Cada oligossacarídeo submetido à metilação ou análise enzimática

**Composição da mistura**
Tipos e quantidades das unidades de monossacarídeos

**Posições das ligações glicosídicas**

**Sequência dos monossacarídeos; posição e configuração das ligações glicosídicas**

**Sequência dos monossacarídeos; posição e configuração das ligações glicosídicas**

**FIGURA 7-38 Métodos para análise de carboidratos.** Um carboidrato purificado no primeiro estágio da análise frequentemente necessita de todas as quatro rotas analíticas para a caracterização completa.

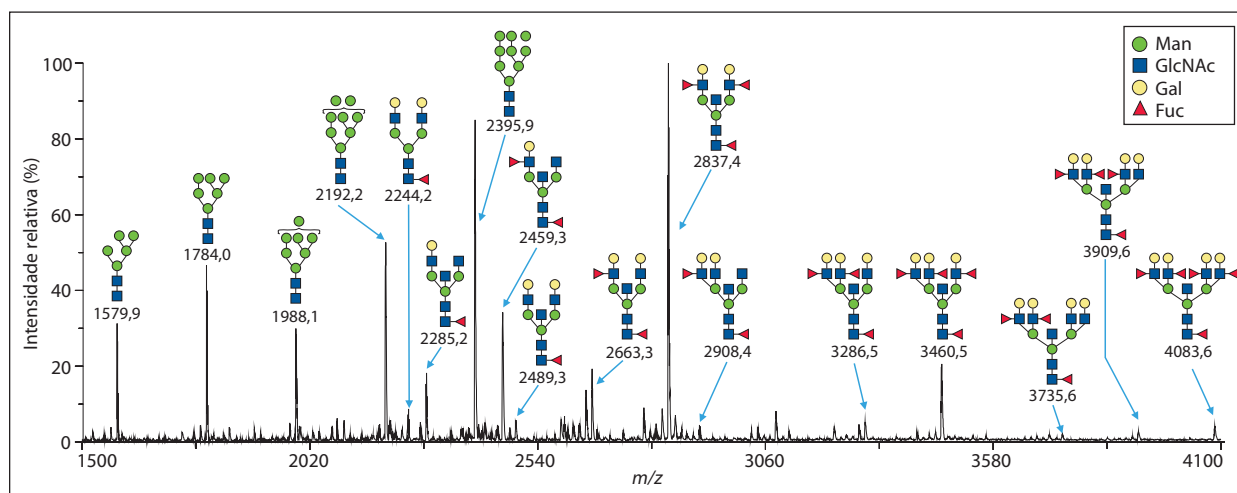



**FIGURA 7-39 Separação e quantificação dos oligossacarídeos em um grupo de glicoproteínas.** Neste experimento, uma mistura de proteínas extraídas de tecido renal foi tratada para a liberação dos oligossacarídeos a partir das glicoproteínas, e os oligossacarídeos foram analisados por espectrometria de massa por dessorção e ionização a *laser* assistida por matriz (MALDI MS). Cada oligossacarídeo distinto produz um pico em sua massa molecular, e a área sob a curva reflete a quantidade daquele oligossacarídeo. O oligossacarídeo mais proeminente aqui (massa de 2.837,4 u) é composto por 13 resíduos de açúcar; outros oligossacarídeos, contendo desde apenas 7 resíduos ou até 19 resíduos, também foram resolvidos por este método.

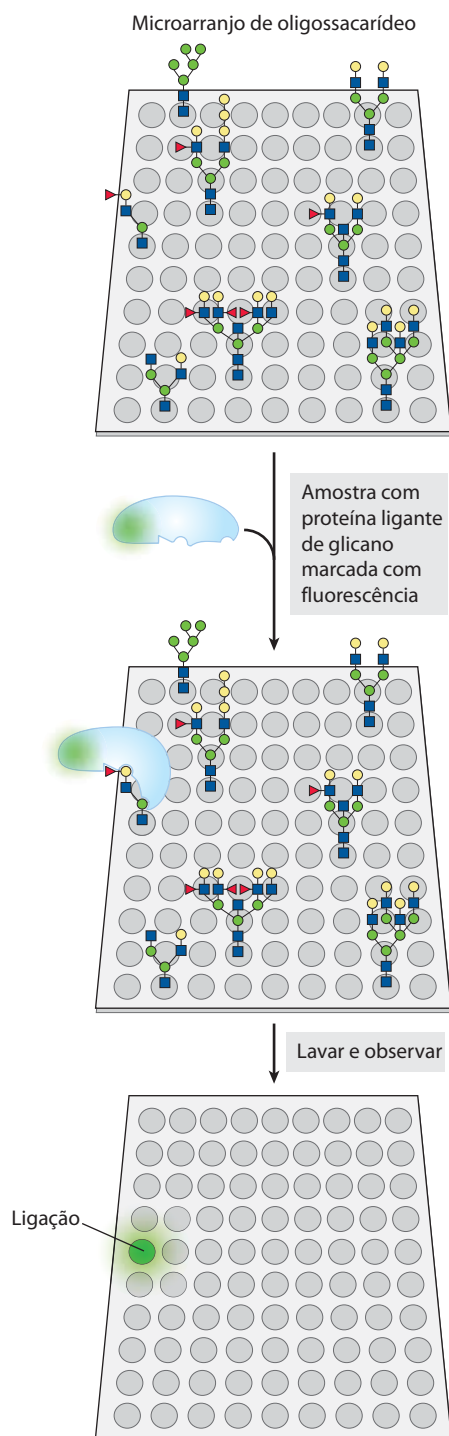



**FIGURA 7-40 Microarranjos de oligossacarídeos para determinar a especificidade e a afinidade da ligação de carboidratos por lectinas.** Soluções de amostras de oligossacarídeos puros, sintetizados ou isolados da natureza, são colocadas em gotículas microscópicas sobre uma lâmina de vidro e aderidas por meio de um espaçador inerte. Cada ponto representa um oligossacarídeo diferente. A amostra de proteína a ser testada para sua afinidade por oligossacarídeos é primeiramente conjugada a um marcador fluorescente, e, então, a amostra é vertida sobre a lâmina, equilibrada, e qualquer proteína não adsorvida é removida. A observação do microarranjo com um microscópio de fluorescência mostra quais pontos apresentam proteína adsorvida (brilham em verde), e a análise da intensidade de florescência permite uma estimativa grosseira da afinidade da ligação proteína-oligossacarídeo.

a estereoquímica da ligação glicosídica e para produzir fragmentos menores para análises adicionais; a metilação para localizar as ligações glicosídicas; e a clivagem gradual para determinar a sequência e a configuração dos carbonos anoméricos.

- A espectrometria de massa e a espectroscopia por RMN de alta resolução, apropriadas para pequenas amostras de carboidrato, geram informações essenciais sobre sequência, configuração dos carbonos anoméricos e outros carbonos e posições das ligações glicosídicas.
- Métodos para síntese em fase sólida produzem oligossacarídeos específicos muito valiosos na exploração das interações lectina-oligossacarídeo e com potencial de se tornar clinicamente úteis.
- Microarranjos de oligossacarídeos puros são úteis para a determinação da especificidade e da afinidade da ligação das lectinas a oligossacarídeos específicos.

## Termos-chave

*Os termos em negrito estão definidos no glossário.*



## Leituras adicionais

### Geral

**Assadi-Porter, F.M., Maillet, E.L., Radek, J.T., Quijaada, J., Markley, J.L., & Max, M.** (2010) Key amino acid residues involved in multi-point binding interactions between brazzein, a sweet protein, and the T1R2–T1R3 human sweet receptor. *J. Mol. Biol.* **398,** 584–599.

**Hayes, J.E.** (2007) Transdisciplinary perspectives on sweetness. *Chemosens. Percept*. **1**, 48–57.
Descrição da teoria do sabor doce discutida no Quadro 7-2.

**Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H.,Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., & Etzler, M.E. (eds).** (2009) *Essentials of Glycobiology*, 2nd. edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Estrutura, biossíntese, metabolismo e função de glicosaminoglicanos, proteoglicanos, glicoproteínas e glicolipídeos, todos apresentados em um nível intermediário e muito bem ilustrado. O livro está disponível gratuitamente *on-line* (www.ncbi.nlm.nih.gov.books/NBK1908).

**Watanabe, H. & Tokuda, G.** (2010) Cellulolytic systems in insects. *Annu. Rev. Entomol*. **55**, 609–632.

## Glicosaminoglicanos e proteoglicanos

**Bishop, J.R., Schuksz, M., & Esko, J.D.** (2007) Heparan sulfate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* **446**, 1030–1037.

**Couchman, J.R.** (2010) Transmembrane signaling proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. **26**, 89–114.
Revisão avançada da função dos proteoglicanos na transdução de sinal em vertebrados.

**Fears, C.Y. & Woods, A.** (2006) The role of syndecans in disease and wound healing. *Matrix Biol.* **25**, 443–456.
Revisão em nível intermediário.

**Frantz, C., Stewart, K.M., & Weaver, V.M.** (2010) The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* **123**, 4195–4200.
Resumo em forma de pôster sobre a matriz extracelular.

**Kirkpatrick, C.A. & Selleck, S.B.** (2007) Heparan sulfate proteoglycans at a glance. *J. Cell Sci*. **120**, 1829–1832.
Resumo em forma de pôster com muitas informações úteis sobre os proteoglicanos.

**Manon-Jensen, T., Itoh, Y., & Couchman, J.R.** (2010) Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *FEBS J.* **277**, 3876–3889.

**Roseman, S.** (2001) Reflections on glycobiology. *J. Biol. Chem.* **276**, 41,527–41,542.
Ótima revisão sobre a história dos estudos em carboidratos e glicosaminoglicanos, escrita por um dos maiores estudiosos desta área.

## Glicoproteínas

**Boraston, A. & Mulloy, B.** (2010) Structural glycobiology: biosynthesis, recognition events, and new methods. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 533–535.
Introdução editorial a uma série de excelente revisões publicadas nesta edição sobre estes assuntos.

**Luac, G. & Zoldos, V.** (2010) Protein glycosylation—an evolutionary crossroad between genes and environment. *Mol. Biol. Syst.* **6**, 2372–2379.
Discussão detalhada sobre os fatores que determinam se e onde uma proteína será glicosilada.

**Molinaro, M.** (2007) *N*-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 313–320.
Revisão em nível intermediário sobre a importância da glicosilação de proteínas no complexo de Golgi.

**Sharon, N. & Gallagher, J.** (2009) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 495–497.
Introdução editorial a uma série de boas revisões sobre glicoproteínas e glicolipídeos publicadas nesta edição da revista.

**Weerapana, E. & Imperiali, B.** (2006) Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology* **16**, 91R–101R.
Revisão em nível intermediário sobre o processo biossintético da glicosilação de proteínas.

## Glicobiologia e o código dos açúcares

**Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., & Davies, G.J.** (2004) Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J.* **382**, 769–781.
Excelente revisão sobre as bases estruturais para a especificidade de proteínas ligantes de açúcar.

**Gabius, H.-J., Andre, S., Jimenez-Barbero, J., Romero, A., & Solis, D.** (2011) From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 298–313.
Revisão em nível intermediário sobre a base estrutural para o reconhecimento de açúcares pelas lectinas.

**Ghosh, P., Dahms, N.M., & Kornfeld, S.** (2003) Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 202–212.

**Hebert, D.N., Garman, S.C., & Molinari, M.** (2005) The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as pro-tein maturation and quality control tags. *Trends Cell Biol.* **15**, 364–370.
Revisão em nível intermediário.

**Helenius, A. & Aebi, M.** (2004) Roles of *N*-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem*. **73**, 1019–1049.

**Lütteke, T., Bohne-Lang, A., Loss, A., Goetz, T., Frank, M., & von der Lieth, C.-W.** (2006) Glycosciences.de: an internet portal to support glycomics and glycobiology research. *Glycobiology* **16**, 71R–81R.

**McEver, R.P. & Zhu, C.** (2010) Rolling cell adhesion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. **26,** 363–396.

**Taylor, M.E. & Drickamer, K.** (2006) *Introduction to Glycobiology*, 2nd edn, Oxford University Press, Oxford.

## Trabalhando com carboidratos

**Fukuda, M. (ed.).** (2006) *Functional Glycomics*, Methods in Enzymology, Vol. 417, Academic Press, Inc., New York.

**Fukuda, M. (ed.).** (2006) *Glycobiology*, Methods in Enzymology, Vol. 415, Academic Press, Inc., New York.

**Fukuda, M. (ed.).** (2006) *Glycomics*, Methods in Enzymology, Vol. 416, Academic Press, Inc., New York.

**Jay, A.** (1996) The methylation reaction in carbohydrate analysis. *J. Carbohydr. Chem.* **15**, 897–923.

**Paulson, J.C., Blixt, O., & Collins, B.E.** (2006) Sweet spots in functional glycomics. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 238–248.
Revisão em nível intermediário sobre as ferramentas desenvolvidas recentemente em glicobiologia.

**Zaia, J.** (2008) Mass spectrometry and the emerging field of glycomics. *Chem. Biol.* **15**, 881–892.
Excelente introdução ao uso de espectrometria de massa para o estudo da estrutura e da função dos glicanos.

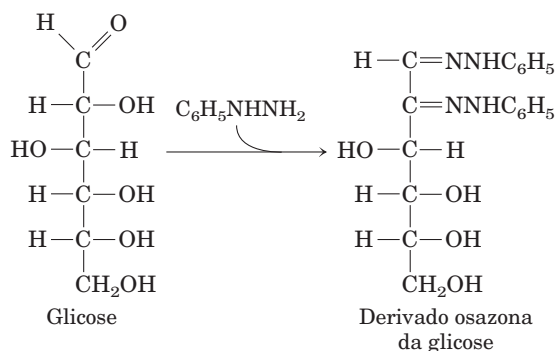
# Problemas

**1. Álcool-açúcares.** Nos derivados de monossacarídeos conhecidos como álcool-açúcares, o oxigênio do carbonil está reduzido a um grupo hidroxila. Por exemplo, o D-gliceraldeído pode ser reduzido a glicerol. Entretanto, este açúcar não é mais designado D ou L. Por quê?

**2. Reconhecendo epímeros.** Usando a Figura 7-3, identifique os epímeros de (a) D-alose, (b) D-gulose e (c) D-ribose em C-2, C-3 e C-4.

**3. Pontos de fusão de derivados osazona de monossacarídeos.** Muitos carboidratos reagem com fenilidrazina ($C_6H_5NHNH_2$) para formar derivados cristalinos de cor amarelo-brilhante conhecidos como osazonas:

$$\begin{array}{ccc}
\begin{array}{c} H\diagdown\;\; O \\ C \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ HO-C-H \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ CH_2OH \end{array} & \xrightarrow{C_6H_5NHNH_2} & \begin{array}{c} H-C{=}NNHC_6H_5 \\ | \\ C{=}NNHC_6H_5 \\ | \\ HO-C-H \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ CH_2OH \end{array}
\end{array}$$

Glicose — Derivado osazona da glicose

As temperaturas de fusão desses derivados são facilmente determinadas e são características para cada osazona. Essas informações foram utilizadas para auxiliar na identificação de monossacarídeos antes do desenvolvimento de HPLC ou cromatografia líquida-gasosa. Estão listados abaixo os pontos de fusão (PFs) de alguns derivados aldose-osazona:

| Monossacarídeo | PF do monossacarídeo anidro (°C) | PF do derivado osazona (°C) |
|---|---|---|
| Glicose | 146 | 205 |
| Manose | 132 | 205 |
| Galactose | 165-168 | 201 |
| Talose | 128-130 | 201 |

Como a tabela mostra, certos pares de derivados têm os mesmos pontos de fusão, embora os monossacarídeos originais não possuam. Por que glicose e manose, e similarmente galactose e talose, formam derivados osazona com o mesmo ponto de fusão?

**4. Configuração e conformação.** Quais ligações na $\alpha$-D-glicose devem ser rompidas para que sua configuração mude para $\beta$-D-glicose? Quais ligações convertem D-glicose a D-manose? Quais ligações convertem uma forma em "cadeira" de D-glicose à outra?

**5. Desoxiaçúcares.** A D-2-desoxigalactose é a mesma molécula química que a D-2-desoxiglicose? Explique.

**6. Estruturas de açúcares.** Descreva as características estruturais comuns e as diferenças para cada par: (a) celulose e glicogênio; (b) D-glicose e D-frutose; (c) maltose e sacarose.

**7. Açúcares redutores.** Desenhe a fórmula estrutural para $\alpha$-D-glicosil-(1→6)-D-manosamina e circule a parte dessa estrutura que torna o composto um açúcar redutor.

**8. Hemiacetal e ligações glicosídicas.** Explique a diferença entre um hemiacetal e um glicosídeo.

**9. Gosto de mel.** A frutose do mel está principalmente na forma $\beta$-D-piranose. Este é um dos carboidratos mais doces que se conhece, em torno de duas vezes mais doce do que a glicose; a forma $\beta$-D-furanose da frutose é muito menos doce. A doçura do mel gradualmente diminui em altas temperaturas. Também o xarope de milho com alto conteúdo de frutose (produto comercial no qual muito da glicose do xarope de milho é convertido em frutose) é utilizado para adoçar bebidas *frias*, mas não *quentes*. Que propriedade química da frutose poderia ser responsável por essas duas observações?

**10. A glicose-oxidase na determinação da glicose sanguínea.** A enzima glicose-oxidase isolada do fungo *Penicillium notatum* catalisa a oxidação de $\beta$-D-glicose a D-glicono-$\delta$-lactona. Essa enzima é altamente específica para o anômero $\beta$ da glicose e não afeta o anômero $\alpha$. Apesar dessa especificidade, a reação catalisada pela glicose-oxidase é comumente utilizada em um ensaio clínico para glicose sanguínea total – isto é, para soluções contendo uma mistura de $\alpha$ e $\beta$-D-glicose. Quais são as condições necessárias para tornar isso possível? Além de possibilitar a detecção de pequenas quantidades de glicose, que vantagem a glicose-oxidase oferece sobre o reagente de Fehling para a dosagem de glicose sanguínea?

**11. A invertase "inverte" a sacarose.** A hidrólise da sacarose (rotação específica +66,5°) gera uma mistura equimolar de D-glicose (rotação específica +52,5°) e D-frutose (rotação específica –92°). (Ver no Problema 4 detalhes sobre rotação específica.)

(a) Sugira uma maneira conveniente para determinar a taxa de hidrólise de sacarose por uma preparação de enzima extraída do revestimento do intestino delgado.

(b) Explique por que, na indústria alimentícia, uma mistura equimolar de D-glicose e D-frutose formada pela hidrólise da sacarose é chamada de açúcar invertido.

(c) A enzima invertase (agora geralmente chamada de sacarase) é deixada agir sobre uma solução de 10% (0,1 g/mL) de sacarose até a hidrólise estar completa. Qual será a rotação óptica da solução observada em um tubo de 10 cm? (Ignore a pequena contribuição possível da enzima.)

**12. Fabricação de chocolates com recheio líquido.** A manufatura de chocolates contendo um centro líquido é uma interessante aplicação da engenharia enzimática. O recheio líquido consiste principalmente em uma solução aquosa de açúcares, rica em frutose para garantir a doçura. O dilema técnico é o seguinte: o revestimento de chocolate deve ser preparado vertendo chocolate derretido quente sobre um centro sólido (ou quase sólido), ainda que o produto final deva ter um centro líquido, rico em frutose. Sugira uma maneira para resolver esse problema. (Dica: A sacarose é muito menos solúvel do que uma mistura de glicose e frutose.)

**13. Anômeros da sacarose?** A lactose existe em duas formas anoméricas, mas nenhuma forma anomérica da sacarose é conhecida. Por quê?

**14. Gentiobiose.** Gentiobiose (D-Glc[$\beta$1→6]D-Glc) é um dissacarídeo encontrado em alguns glicosídeos vegetais. Desenhe a estrutura da gentiobiose com base em seu nome abreviado. A gentiobiose é um açúcar redutor? Sofre mutarrotação?

**15. Identificação de açúcares redutores.** *N*-acetil-$\beta$-D-glicosamina (Figura 7-9) é um açúcar redutor? E D-gliconato? O dissacarídeo GlcN($\alpha$1↔1$\alpha$)Glc é um açúcar redutor?

**16. Digestão da celulose.** A celulose poderia ser uma forma de glicose extremamente abundante e barata, porém os seres humanos não conseguem digeri-la. Por quê? Se lhe oferecessem uma maneira que permitisse adquirir esta capacidade, você aceitaria ou não, e por qual motivo?

**17. Propriedades físicas da celulose e do glicogênio.** A celulose praticamente pura obtida dos fios das sementes de *Gossypium* (algodão) é resistente, fibrosa e completamente insolúvel em água. Em contrapartida, o glicogênio extraído de músculo ou fígado se dispersa prontamente em água quente, formando uma solução turva. Apesar das propriedades físicas marcadamente diferentes, ambas as substâncias são polímeros de D-glicose em ligações (1→4) com massa molecular comparável. Quais características estruturais desses dois polissacarídeos

geram suas diferentes propriedades físicas? Explique as vantagens biológicas das respectivas propriedades de cada polímero.

**18. Dimensões de um polissacarídeo.** Compare as dimensões de uma molécula de celulose e uma molécula de amilose, cada uma com $M_r$ de 200.000.

**19. Velocidade de crescimento do bambu.** Os caules do bambu, gramínea tropical, podem crescer a 0,3 m/dia sob condições ótimas. Dado que os caules são compostos quase que inteiramente por fibras de celulose orientadas no sentido do crescimento, calcule o número de resíduos de açúcar que devem ser enzimaticamente adicionados a cada segundo às cadeias crescentes de celulose para produzir essa velocidade de crescimento. Cada unidade de D-glicose contribui com ~0,5 nm para o comprimento de uma molécula de celulose.

**20. Glicogênio como armazenamento de energia: por quanto tempo uma ave cinegética consegue voar?** Desde a antiguidade, tem se observado que certas aves cinegéticas, como o galo silvestre, a codorna e o faisão, são facilmente levadas à fadiga. O historiador grego Xenofonte escreveu, "As abetardas (*Otis tarda*) podem ser capturadas se você for rápido em incitá-las, pois voarão apenas uma curta distância, como perdizes, e em breve se cansarão; e sua carne é deliciosa". Os músculos de voo das aves cinegéticas dependem quase que inteiramente do uso de glicose-1-fosfato para energia, na forma de ATP (ver Capítulo 14). A glicose-1-fosfato é produzida pela clivagem do glicogênio armazenado no músculo, catalisada pela enzima glicogênio-fosforilase. A taxa de produção de ATP é limitada pela taxa na qual o glicogênio pode ser degradado. Durante um "voo de pânico", a taxa de clivagem do glicogênio das aves de caça é bastante alta, cerca de 120 $\mu$mol/min de glicose-1-fosfato produzidos por grama de tecido. Dado que os músculos de voo normalmente contêm aproximadamente 0,35% de glicogênio por peso, calcule por quanto tempo uma ave cinegética pode voar. (Presuma que a massa molecular média de um resíduo de glicose no glicogênio seja de 162 g/mol.)

**21. Estabilidade relativa de dois confôrmeros.** Explique por que as duas estruturas mostradas na Figura 7-18b são tão diferentes energeticamente (em estabilidade). Dica: ver Figura 1-22.

**22. Volume do sulfato de condroitina em solução.** Uma função crucial do sulfato de condroitina é agir como lubrificante em articulações esqueléticas pela criação de um meio gelatinoso elástico e resistente à fricção e ao choque. Essa função parece estar relacionada a uma propriedade peculiar do sulfato de condroitina: o volume ocupado por uma molécula é muito maior em solução do que quando em sólido desidratado. Por que o volume é tão maior em solução?

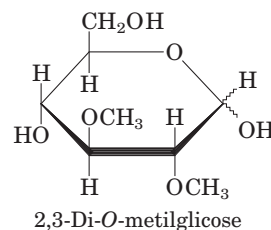
**23. Interações da heparina.** A heparina, um glicosaminoglicano negativamente carregado, é utilizada como anticoagulante. Ela age pela ligação a algumas proteínas plasmáticas, incluindo antitrombina III, um inibidor da coagulação sanguínea. A ligação 1:1 da heparina à antitrombina III parece causar uma alteração na conformação da proteína que aumenta bastante sua capacidade de inibir a coagulação. Quais resíduos de aminoácidos da antitrombina III provavelmente interagem com a heparina?

**24. Permutações de um trissacarídeo.** Pense sobre como estimar o número de possíveis trissacarídeos compostos por *N*-acetilglicosamina-4-sulfato (GlcNAc4S) e ácido glicurônico (GlcA) e desenhe 10 deles.

**25. Efeito do ácido siálico sobre eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS.** Suponha que você tem quatro formas de uma proteína, todas com sequências de aminoácidos idênticas, porém contendo zero, uma, duas ou três cadeias de oligossacarídeos, cada qual terminando com um único resíduo de ácido siálico. Desenhe o padrão que você esperaria em um gel caso uma mistura dessas quatro glicoproteínas fosse resolvida por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (ver Figura 3-18) e corada para proteínas. Identifique todas as bandas em seu desenho.

**26. Conteúdo de informação dos oligossacarídeos.** A porção carboidrato de algumas glicoproteínas pode servir como um sítio para o reconhecimento celular. Para desempenhar esta função, os oligossacarídeos devem ter o potencial para existir em uma grande variedade de formas. O que poderia produzir uma maior variedade de estruturas: oligopeptídeos compostos por cinco diferentes resíduos de aminoácidos ou oligossacarídeos compostos por cinco resíduos de monossacarídeos diferentes? Explique.

**27. Determinação do conteúdo de ramificações na amilopectina.** A quantidade de ramificações (número de ligações glicosídicas ($\alpha 1 \rightarrow 6$)) na amilopectina pode ser determinada pelo seguinte procedimento. Uma amostra de amilopectina é exaustivamente metilada – tratada com um agente metilante (iodeto de metil) que substitui o hidrogênio da hidroxila de cada açúcar por um grupo metil, convertendo –OH a $-OCH_3$. Todas as ligações glicosídicas na amostra tratada são, então, hidrolisadas em uma solução aquosa ácida, e a quantidade de 2,3-di-*O*-metilglicose assim formada é determinada.

2,3-Di-*O*-metilglicose

(a) Explique o princípio desse procedimento para a determinação do número de pontos de ramificação ($\alpha 1 \rightarrow 6$) na amilopectina. O que acontece com os resíduos de glicose não ramificados da amilopectina durante o processo de metilação e hidrólise?

(b) Uma amostra de 258 mg de amilopectina tratada como descrito acima produziu 12,4 mg de 2,3-di-*O*-metilglicose. Determine a porcentagem de resíduos de glicose da amilopectina que continha uma ramificação ($\alpha 1 \rightarrow 6$). (Assuma que a massa molecular média de um resíduo de glicose na amilopectina é 162 g/mol.)

**28. Análise estrutural de um polissacarídeo.** Um polissacarídeo de estrutura desconhecida foi isolado, submetido à metilação exaustiva e hidrolisado. A análise dos produtos mostrou três açúcares metilados: 2,3,4-tri-*O*-metil-D-glicose, 2,4-di-*O*-metil-D-glicose e 2,3,4,6-tetra-*O*-metil-D-glicose, na proporção 20:1:1. Qual é a estrutura do polissacarídeo?

## Problema de análise de dados

**29. Determinação da estrutura dos antígenos do grupo sanguíneo ABO.** O sistema ABO dos grupos sanguíneos humanos foi descoberto em 1901, e em 1924 foi mostrado que

esta característica é herdada em um único *locus* gênico com três alelos. Em 1960, W. T. J. Morgan publicou um artigo revisando o que era conhecido sobre a estrutura das moléculas dos antígenos ABO naquela época. Quando o artigo foi publicado, as estruturas completas dos antígenos A, B e O ainda não eram conhecidas; este artigo é um exemplo da "construção" do conhecimento científico.

Em qualquer tentativa para determinar a estrutura de um composto biológico desconhecido, os pesquisadores devem lidar com dois problemas fundamentais: (1) Se você não sabe o que *é*, como sabe que *está* puro? (2) Se você não sabe o que *é*, como sabe que as condições de extração e purificação não *alteraram a estrutura*? Morgan examinou o problema (1) por meio de alguns métodos. Um método é descrito em seu artigo (p. 312) como observação de "valores analíticos constantes após testes de solubilização fracionada". Neste caso, "valores analíticos" são medidas de composição química, ponto de fusão, e assim por diante.

(a) Com base em seu entendimento das técnicas químicas, o que Morgan quis dizer com "testes de solubilização fracionada"?

(b) Por que os valores analíticos obtidos após testes de solubilização fracionada de uma substância *pura* seriam constantes e aqueles de uma substância *impura* não seriam constantes?

Morgan examinou o problema (2) utilizando um ensaio que mede a atividade imune da substância presente em diferentes amostras.

(c) Por que é importante para os estudos de Morgan, e especialmente para examinar o problema (2), que este ensaio de atividade seja quantitativo (dosando o nível de atividade) em vez de simplesmente qualitativo (determinando a presença ou a ausência da substância)?

A estrutura dos antígenos do grupo sanguíneo está mostrada na Figura 10-15. Em seu artigo (p. 314), Morgan listou algumas propriedades dos três antígenos, A, B e O, que eram conhecidas naquela época:

1. O antígeno do tipo B tem um conteúdo de galactose maior do que os antígenos A ou O.
2. O antígeno do tipo A contém mais aminoaçúcares do que os antígenos B ou O.
3. A razão glicosamina/galactosamina para o antígeno A é aproximadamente 1,2, e para o antígeno B é cerca de 2,5.

(d) Qual(is) dessas conclusões é(são) consistente(s) com as estruturas conhecidas dos antígenos do grupo sanguíneo?

(e) Como você explicaria as discrepâncias entre os resultados de Morgan e as estruturas conhecidas?

Em um trabalho posterior, Morgan e seus colaboradores utilizaram uma inteligente estratégia para adquirir informações estruturais sobre os antígenos do grupo sanguíneo. Haviam sido encontradas enzimas que degradariam os antígenos especificamente. Entretanto, essas enzimas estavam disponíveis apenas como preparações enzimáticas brutas, possivelmente contendo mais de uma enzima com especificidade desconhecida. A degradação dos antígenos do tipo sanguíneo por estas enzimas brutas poderia ser inibida pela adição à reação de moléculas de açúcar específicas. Apenas açúcares encontrados nos antígenos do tipo sanguíneo causariam essa inibição. Uma preparação enzimática, isolada do protozoário *Trichomonas foetus*, degradaria todos os três antígenos, sendo inibida pela adição de açúcares específicos. Os resultados desses estudos estão resumidos na tabela a seguir, mostrando a porcentagem de substrato que permaneceu inalterada quando a enzima de *T. foetus* agiu sobre os antígenos do grupo sanguíneo na presença de açúcares.

| | Substrato inalterado (%) | | |
|---|---|---|---|
| **Açúcar adicionado** | **Antígeno A** | **Antígeno B** | **Antígeno O** |
| Controle – sem açúcar | 3 | 1 | 1 |
| L-Fucose | 3 | 1 | 100 |
| D-Fucose | 3 | 1 | 1 |
| L-Galactose | 3 | 1 | 3 |
| D-Galactose | 6 | 100 | 1 |
| *N*-Acetilglicosamina | 3 | 1 | 1 |
| *N*-Acetilgalactosamina | 100 | 6 | 1 |

Para o antígeno O, a comparação entre os resultados do controle e da L-fucose mostra que a L-fucose inibe a degradação do antígeno. Esse é um exemplo de inibição pelo produto, na qual um excesso do produto da reação desloca o equilíbrio da reação, impedindo a adicional hidrólise do substrato.

(f) Embora o antígeno O contenha galactose, *N*-acetilglicosamina e *N*-acetilgalactosamina, nenhum desses açúcares inibiu a degradação desse antígeno. Com base nesse resultado, a preparação enzimática de *T. foetus* é uma endoglicosidase ou uma exoglicosidase? (Endoglicosidases clivam ligações entre resíduos internos; exoglicosidases removem um resíduo de cada vez a partir da extremidade de um polímero.) Explique seu raciocínio.

(g) Quais dos resultados em (f) e (g) são consistentes com as estruturas mostradas na Figura 10-15? Explique seu raciocínio.

## Referência

**Morgan, W.T.J.** (1960) The Croonian Lecture: a contribution to human biochemical genetics; the chemical basis of blood-group specificity. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*. **151**, 308–347.

# 8

# Nucleotídeos e Ácidos Nucleicos



Nucleotídeos apresentam uma variedade de funções no metabolismo celular. Eles são a moeda energética nas transações metabólicas; são as ligações químicas essenciais nas respostas da célula a hormônios e a outros estímulos extracelulares; e também são os componentes estruturais de uma estrutura ordenada de cofatores enzimáticos e intermediários metabólicos. E, por último, mas não menos importante, eles são os constituintes dos ácidos nucleicos: ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA), os repositórios moleculares da informação genética. A estrutura de cada proteína – e, em última análise, de cada biomolécula e componente celular – é o produto da informação programada na sequência nucleotídica dos ácidos nucleicos da célula. A capacidade de armazenar e transmitir a informação genética de uma geração a outra é uma condição fundamental para a vida.

Este capítulo fornece uma visão geral da natureza química dos nucleotídeos e ácidos nucleicos encontrados na maioria das células; uma abordagem mais detalhada da função dos ácidos nucleicos é o foco da Parte III deste texto.

## 8.1 Alguns dados básicos

**Nucleotídeos, os blocos de construção dos ácidos nucleicos** A sequência de aminoácidos de cada proteína na célula e a sequência nucleotídica de cada RNA são especificadas pela sequência nucleotídica do DNA da célula. Um segmento de uma molécula de DNA que contém a informação necessária para a síntese de um produto biologicamente funcional, seja proteína ou RNA, é denominado **gene**. Uma célula costuma ter muitos milhares de genes, e moléculas de DNA, não surpreendentemente, tendem a ser muito grandes. O armazenamento e a transferência da informação biológica são as únicas funções conhecidas do DNA.

O RNA tem uma ampla variedade de funções e muitas classes são encontradas nas células. Os **RNA ribossomais** (**rRNAs**) são componentes dos ribossomos, os complexos que executam a síntese proteica. Os **RNAs mensageiros** (**mRNAs**) são intermediários, carregando a informação genética de um ou poucos genes para o ribossomo, onde as proteínas correspondentes podem ser sintetizadas. Os **RNAs transportadores** (**tRNAs**) são moléculas adaptadoras que traduzem fielmente a informação no mRNA em uma sequência específica de aminoácidos. Além dessas classes maiores, existe uma grande variedade de tipos de RNA com funções especiais, descritos detalhadamente na Parte III.

### Nucleotídeos e ácidos nucleicos têm pentoses e bases características

Os **nucleotídeos** apresentam três componentes característicos: (1) uma base nitrogenada (contendo nitrogênio), (2) uma pentose e (3) um ou mais fosfatos (**Figura 8-1**). A molécula sem o grupo fosfato é denominada **nucleosídeo**. As bases nitrogenadas são derivadas de dois compostos re-

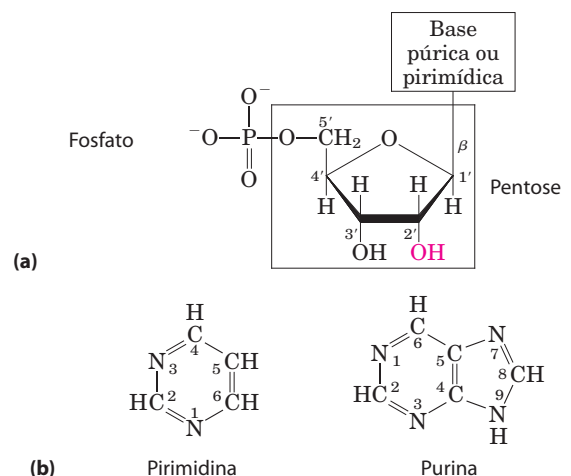



**FIGURA 8-1 Estrutura de nucleotídeos. (a)** A estrutura geral mostrando a convenção numérica do anel de pentose. Esse é um ribonucleotídeo. Nos desoxirribonucleotídeos, o grupo —OH no carbono 2′ (vermelho) é substituído por H. **(b)** Os compostos ancestrais das bases pirimídicas e púricas dos nucleotídeos e dos ácidos nucleicos, mostrando a convenção numérica.

lacionados, a **pirimidina** e a **purina**. As bases e as pentoses dos nucleotídeos comuns são compostos heterocíclicos.

**CONVENÇÃO-CHAVE:** Os átomos de carbono e de nitrogênio nas estruturas relacionadas são numerados convencionalmente para facilitar a denominação e a identificação dos muitos compostos derivados. A convenção para o anel da pentose segue as regras descritas no Capítulo 7, mas, nas pentoses dos nucleotídeos e nucleosídeos, os números dos carbonos recebem a designação de um apóstrofo (′) para diferenciá-los dos átomos numerados nas bases nitrogenadas. ■

A base de um nucleotídeo é ligada covalentemente (no N-1 das pirimidinas e no N-9 das purinas) por uma ligação *N*-$\beta$-glicosídica ao carbono 1′ da pentose, e o fosfato é esterificado no carbono 5′. A ligação *N*-$\beta$-glicosídica é formada pela remoção dos elementos de água (um grupo hidroxila da pentose e o hidrogênio da base), como na formação da ligação *O*-glicosídica (ver Figura 7-30).

Tanto o DNA quanto o RNA contêm duas bases púricas principais, **adenina** (A) e **guanina** (G), e duas pirimídicas. No DNA e no RNA, uma das pirimidinas é a **citosina** (C), mas a segunda pirimidina não é a mesma nos dois: é a **timina** (T) no DNA e a **uracila** (U) no RNA. Apenas raramente a timina é encontrada no RNA ou a uracila no DNA. As estruturas das cinco principais bases estão mostradas na **Figura 8-2,** e a nomenclatura de seus nucleotídeos e nucleosídeos correspondentes está resumida na Tabela 8-1.

Os ácidos nucleicos têm dois tipos de pentoses. As recorrentes unidades desoxirribonucleotídicas do DNA contêm 2′-desóxi-D-ribose e as unidades ribonucleotídicas do RNA contêm D-ribose. Nos nucleotídeos, ambos os tipos de pentoses estão na sua forma $\beta$-furanose (anel fechado com cinco átomos). Como mostra a **Figura 8-3**, o anel de pentose não é planar, mas ocorre em uma série de conformações geralmente descritas como "pregueadas".

**CONVENÇÃO-CHAVE:** Embora o DNA e do RNA pareçam ter duas diferenças – pentoses diferentes e a presença de uracila no RNA e timina no DNA – é a pentose que define a identidade do ácido nucleico. Se o ácido nucleico contém 2′-desoxi-D-ribose, é DNA por definição, embora possa apresentar alguma uracila. Da mesma forma, se o ácido nucleico contém D-ribose é RNA, independentemente da sua composição de base. ■

Adenina    Guanina
**Purinas**

Citosina    Timina (DNA)    Uracila (RNA)
**Pirimidinas**

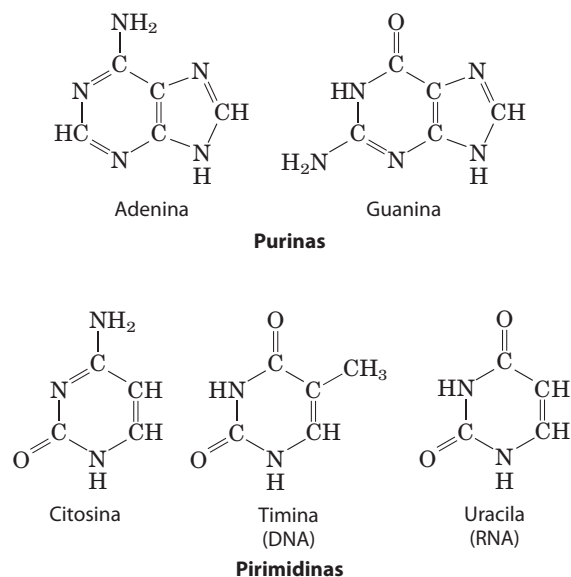



**FIGURA 8-2 Principais bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucleicos.** Alguns dos nomes comuns dessas bases refletem as circunstâncias das suas descobertas. A guanina, por exemplo, foi primeiramente isolada de guano (esterco de pássaro) e a timina foi isolada originariamente de tecido do timo.

A **Figura 8-4** mostra as estruturas e os nomes dos quatro principais **desoxirribonucleotídeos** (desoxirribonucleosídeo 5′-monofosfato), as unidades estruturais dos DNAs, e os quatro principais **ribonucleotídeos** (ribonucleosídeo 5′-monofosfato), as unidades estruturais dos RNAs.

**TABELA 8-1** Nomenclatura de nucleotídeo e de ácido nucleico

| Base | Nucleosídeo | Nucleotídeo | Ácido nucleico |
|---|---|---|---|
| **Purinas** | | | |
| Adenina | Adenosina | Adenilato | RNA |
| | Desoxiadenosina | Desoxiadenilato | DNA |
| Guanina | Guanosina | Guanilato | RNA |
| | Desoxiguanosina | Desoxiguanilato | DNA |
| **Pirimidinas** | | | |
| Citosina | Citidina | Citidilato | RNA |
| | Desoxicitidina | Desoxicitidilato | DNA |
| Timina | Timidina ou desoxitimidina | Timidilato ou desoxitimidilato | DNA |
| Uracila | Uridina | Uridilato | RNA |

**Nota:** "Nucleosídeo" e "nucleotídeo" são termos genéricos que incluem ambas as formas ribo ou desoxirribo. Também, ribonucleosídeos ou ribonucleotídeos são aqui designados simplesmente como nucleosídeos e nucleotídeos (p. ex., riboadenosina como adenosina), e desoxirribonucleosídeos e desoxirribonucleotídeos como desoxinucleosídeos e desoxinucleotídeos (p. ex., desoxirriboadenosina como desoxiadenosina). Ambas as formas de denominação são aceitas, mas os nomes mais curtos são mais comumente usados. A timina é uma exceção; "ribotimidina" é usado para descrever sua ocorrência incomum no RNA.

(a) Aldeído ⇌ $\beta$-Furanose

(b) C-2′ endo, C-2′ exo, C-3′ endo, C-3′ exo, Base, 1′, 2′, 3′, 4′, 5′

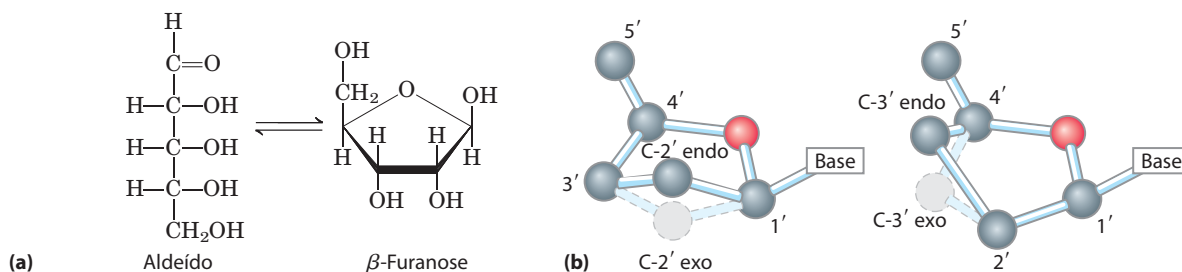



**FIGURA 8-3 Conformação da ribose. (a)** Em solução, as formas de cadeia reta (aldeído) e em anel ($\beta$-furanose) da ribose livre estão em equilíbrio. O RNA contém apenas a forma em anel, a $\beta$-D-ribofuranose. A desoxirribose sofre uma interconversão semelhante em solução, mas no DNA existe apenas a $\beta$-2′-desoxi-D-ribofuranose. **(b)** Os anéis de ribofuranose nos nucleotídeos podem existir em quatro diferentes conformações pregueadas. Em todos os casos, quatro dos cinco átomos estão em uma forma planar. O quinto átomo (C-2′ ou C-3′) está no mesmo lado (endo) ou no lado oposto (exo) do plano em relação ao átomo de C-5′.

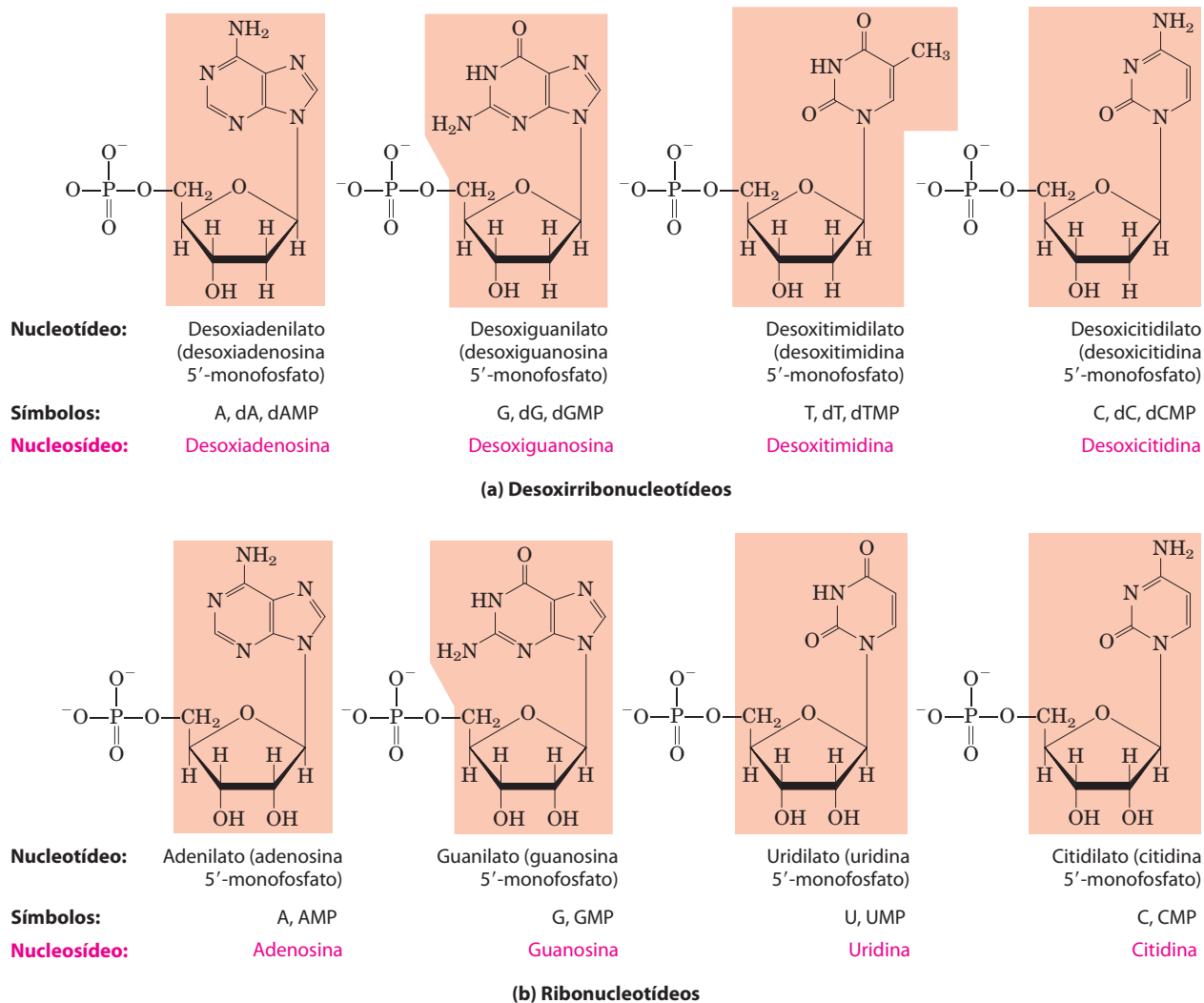



**FIGURA 8-4 Desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos dos ácidos nucleicos.** Todos os nucleotídeos estão mostrados nas suas formas livres em pH 7,0. As unidades nucleotídicas do DNA **(a)** são em geral simbolizadas como A, G, T e C e, algumas vezes, como dA, dG, dT e dC; aquelas do RNA **(b)** como A, G, U e C. Na sua forma livre, os desoxirribonucleotídeos são comumente abreviadas como dAMP, dGMP, dTMP e dCMP; os ribonucleotídeos, AMP, GMP, TMP e CMP. Para cada nucleotídeo, os nomes comuns são seguidos pelo nome completo entre parênteses. Todas as abreviaturas assumem que o grupamento fosfato está na posição 5′. A porção nucleosídica de cada molécula está sombreada em cor salmão. Nesta e nas próximas ilustrações, os carbonos do anel não estão mostrados.

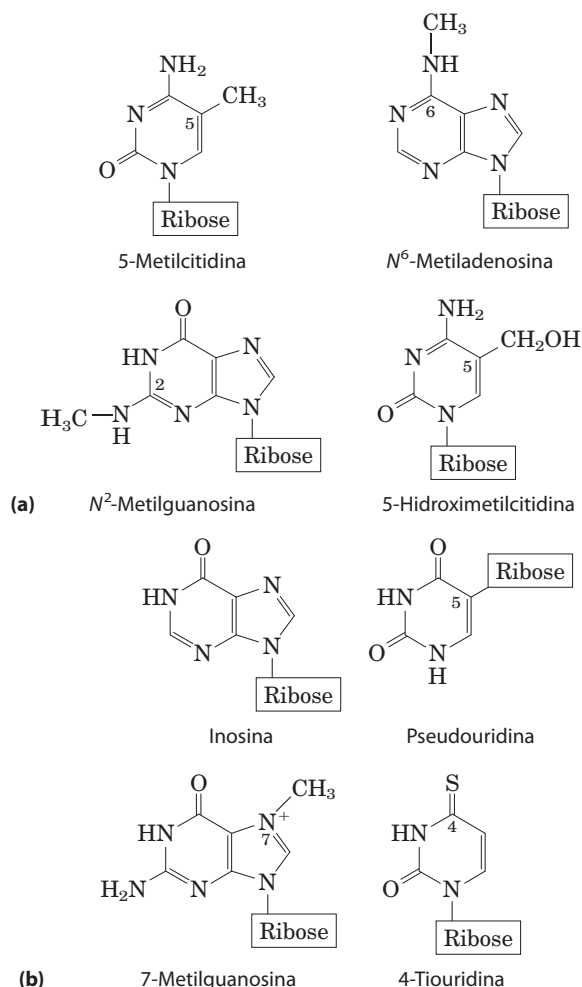



**FIGURA 8-5 Algumas bases púricas e pirimídicas secundárias, mostradas como nucleosídeos. (a)** Bases secundárias do DNA. A 5-metilcitidina ocorre no DNA de animais e de plantas superiores, a $N^6$-metiladenosina no DNA bacteriano e a 5-hidroximetilcitidina no DNA de animais e bactérias infectadas por determinados bacteriófagos. **(b)** Algumas bases secundárias do tRNA. A inosina contém a base hipoxantina. Observe que a pseudouridina, como a uridina, contém uracila; elas são diferentes no ponto de ligação à ribose – na uridina, a uracila é ligada pelo N-1, o ponto de ligação usual para pirimidinas; na pseudouridina, pelo C-5.

**FIGURA 8-6 Algumas adenosina monofosfatos.** Adenosina 2′-monofosfato, adenosina 3′-monofosfato e adenosina 2′,3′-monofosfato cíclico são formados por hidrólise enzimática e alcalina do RNA.

Embora os nucleotídeos que contêm as principais purinas e pirimidinas sejam os mais comuns, o DNA e o RNA também contêm algumas bases secundárias (**Figura 8-5**). No DNA, as mais comuns delas são as formas metiladas das bases principais; em alguns DNA virais, algumas bases podem ser hidroximetiladas ou glicosiladas. As bases alteradas ou raras na molécula de DNA muitas vezes apresentam funções na regulação ou na proteção da informação genética. Bases secundárias de muitos tipos também são encontradas nos RNAs, especialmente nos tRNAs (ver Figuras 8-25 e 26-22).

**CONVENÇÃO-CHAVE:** A nomenclatura para as bases secundárias pode ser confusa. Assim como as bases principais, muitas têm nomes comuns – hipoxantina, por exemplo, mostrada como seu nucleosídeo inosina na Figura 8-5. Quando um átomo no anel púrico ou pirimídico é substituído, a convenção usual (utilizada aqui) é simplesmente para indicar a posição no anel do átomo substituído pelo seu número – por exemplo, 5-metilcitosina, 7-metilguanina e 5-hidroximetilcitosina (mostrados como nucleosídeos na Figura 8-5). O elemento ao qual o átomo substituído é ligado (N, C, O) não é identificado. A convenção muda quando o átomo substituído é exocíclico (não se encontra dentro da estrutura cíclica), nesse caso o tipo de átomo é identificado e a posição no anel no qual ele é ligado é indicada por sobrescrito. O nitrogênio amino ligado ao C-6 da adenina é $N^6$; da mesma forma, o oxigênio da carbonila e o nitrogênio amino no C-6 e no C-2 da guanina são $O^6$ e $N^2$, respectivamente. Exemplos dessa nomenclatura são $N^6$-metiladenosina e $N^2$-metilguanosina (Figura 8-5). ■

As células também contêm nucleotídeos com grupos fosfato em posições diferentes do carbono 5′ (**Figura 8-6**). Os **ribonucleosídeos 2′,3′-monofosfato cíclicos** são intermediários isoláveis e os **ribonucleosídeos 3′-monofosfato** são os produtos finais de hidrólise do RNA por certas ribonucleases. Outras variações são adenosina 3′,5′-monofosfato cíclico (cAMP) e guanosina 3′,5′-monofosfato cíclico (cGMP), considerados no final deste capítulo.

## Ligações fosfodiéster ligam nucleotídeos consecutivos nos ácidos nucleicos

Os nucleotídeos consecutivos de ambos DNA e RNA são ligados covalentemente por "pontes" de grupos fosfato, nas quais o grupo 5′-fosfato de uma unidade nucleotídica é ligado ao grupo 3′-hidroxila do próximo nucleotídeo, criando uma **ligação fosfodiéster** (**Figura 8-7**). Portanto, o esqueleto covalente dos ácidos nucleicos consiste em fosfatos e resíduos de pentose alternados, e as

bases nitrogenadas podem ser consideradas como grupos laterais ligados ao esqueleto em intervalos regulares. O esqueleto do DNA e do RNA são hidrofílicos. Os grupos hidroxila dos resíduos de açúcar formam ligações de hidrogênio com a água. Os grupos fosfato, com um p$K_a$ próximo a 0, são completamente ionizados e carregados negativamente em pH 7, e as cargas negativas são, de um modo geral, neutralizadas pelas interações iônicas com cargas positivas nas proteínas, nos íons metálicos e nas poliaminas.

**CONVENÇÃO-CHAVE:** Todas as ligações fosfodiéster no DNA e no RNA têm a mesma orientação ao longo da cadeia (Figura 8-7), conferindo a cada fita do ácido nucleico uma polaridade específica e extremidades 5′ e 3′ diferentes. Por definição, a **extremidade 5′** não apresenta um nucleotídeo na posição 5′, e a **extremidade 3′** não apresenta um nucleotídeo na posição 3′. Outros grupos (mais frequentemente um ou mais fosfatos) podem estar presentes em uma ou em ambas as extremidades. A orientação 5′ para 3′ de uma fita de ácido nucleico refere-se a uma *extremidade* da fita, não a orientação da ligação fosfodiéster individual ligando seus nucleotídeos constituintes. ■

O esqueleto covalente do DNA e do RNA está sujeito a hidrólise lenta e não enzimática das ligações fosfodiéster. No tubo de ensaio, o RNA é hidrolisado rapidamente em condições alcalinas, mas não o DNA; os grupamentos 2′-hidroxila no RNA (ausentes no DNA) estão diretamente envolvidos nesse processo. Os nucleotídeos 2′,3′-monofosfato cíclicos são os primeiros produtos da ação de álcalis sobre o RNA e são rapidamente hidrolisados para gerar uma mistura de 2′ e 3′-nucleosídeos monofosfato (**Figura 8-8**).

As sequências nucleotídicas dos ácidos nucleicos podem ser representadas esquematicamente, como ilustrado a seguir, por um segmento de DNA com cinco unidades nucleotídicas. Os grupos fosfato são simbolizados pelo Ⓟ, e

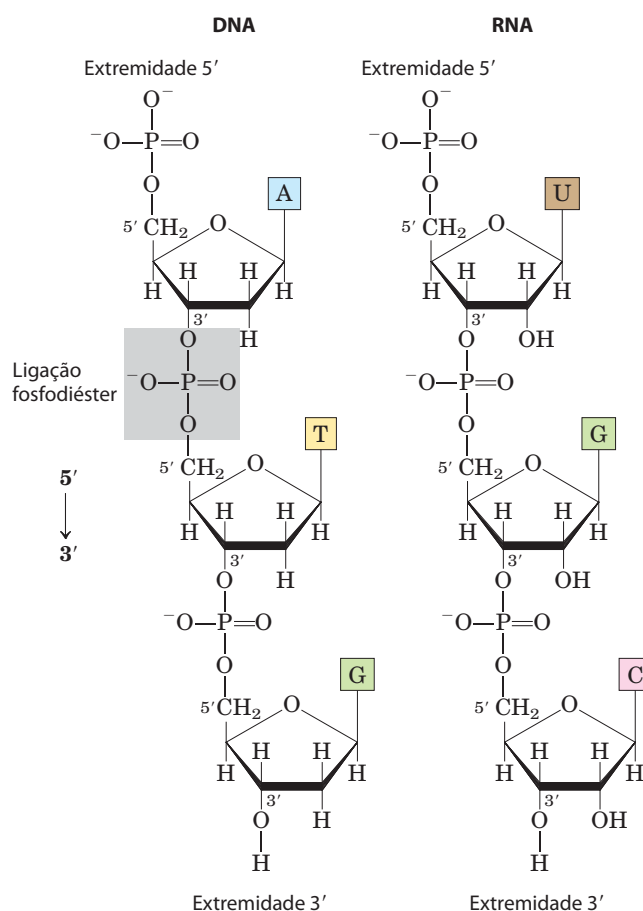



**FIGURA 8-7 Ligações fosfodiéster no esqueleto covalente do DNA e do RNA.** As ligações fosfodiéster (uma das quais está sombreada no DNA) ligam unidades nucleotídicas sucessivas. O esqueleto de pentose e grupamentos fosfato alternados nos dois tipos de ácidos nucleicos é altamente polar. As extremidades 5′ e 3′ da macromolécula podem estar livres ou podem estar ligados a um grupo fosforil.

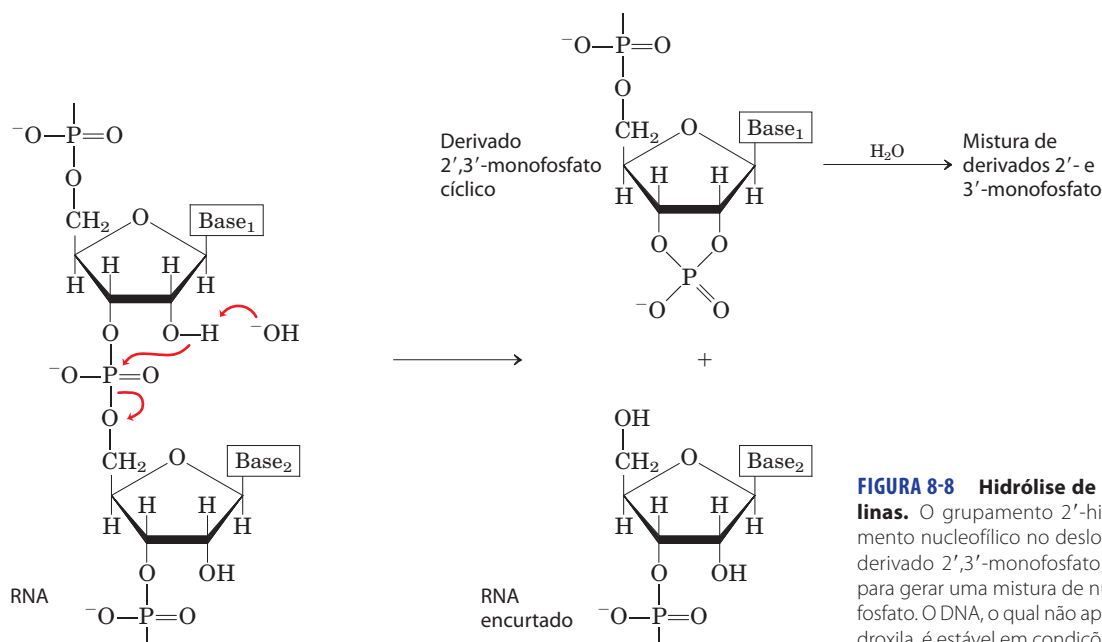
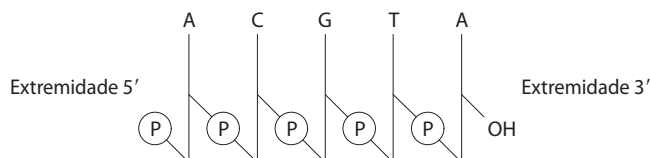



**FIGURA 8-8 Hidrólise de RNA em condições alcalinas.** O grupamento 2′-hidroxila atua como grupamento nucleofílico no deslocamento intramolecular. O derivado 2′,3′-monofosfato cíclico é mais hidrolisado para gerar uma mistura de nucleosídeos 2′- e 3′-monofosfato. O DNA, o qual não apresenta grupamentos 2′-hidroxila, é estável em condições semelhantes.

cada desoxirribose é simbolizada por uma linha vertical, a partir do C-1′ na parte superior para o C-5′ na parte inferior (mas lembre-se de que, nos ácidos nucleicos, o açúcar está sempre na sua forma de anel fechado de $\beta$-furanose). As linhas de conexão entre os nucleotídeos (as quais passam pelo Ⓟ) estão desenhadas diagonalmente a partir do centro (C-3′) da desoxirribose de um nucleotídeo para a parte inferior (C-5′) do próximo nucleotídeo.

A C G T A
Extremidade 5′ Ⓟ Ⓟ Ⓟ Ⓟ Ⓟ OH Extremidade 3′

Algumas representações mais simples desse pentadesoxirribonucleotídeo são pA-C-G-T-$A_{OH}$, pApCpGpTpA e pACGTA.

**CONVENÇÃO-CHAVE:** A sequência de uma fita simples de ácido nucleico é sempre escrita com a sua extremidade 5′ à esquerda e com a extremidade 3′ à direita – isto é, na direção 5′→3′. ■

Um ácido nucleico pequeno é denominado **oligonucleotídeo**. A definição de "pequeno" é um tanto arbitrária, mas polímeros contendo 50 nucleotídeos ou menos em geral são chamados de oligonucleotídeos. Um ácido nucleico maior é chamado de **polinucleotídeo**.

## As propriedades das bases nucleotídicas afetam a estrutura tridimensional dos ácidos nucleicos

Purinas e pirimidinas livres são compostos fracamente básicos e, por isso, são chamados de bases. As purinas e as pirimidinas comuns no DNA e no RNA são moléculas aromáticas (Figura 8-2), uma propriedade com consequências importantes para a estrutura, a distribuição dos elétrons e a absorção de luz dos ácidos nucleicos. O deslocamento dos elétrons entre os átomos no anel confere à maioria das ligações caráter parcial de ligação dupla. O resultado é que as pirimidinas são moléculas planares e as purinas são muito próximas a uma estrutura planar, com uma leve prega. Bases púricas e pirimídicas livres podem existir em duas ou mais formas tautoméricas, dependendo do pH. A uracila, por exemplo, ocorre nas formas lactâmicas, lactímicas e lactímicas duplas (**Figura 8-9**). As estruturas mostradas na Figura 8-2 são os tautômeros que predominam em pH 7,0. Todas as bases nucleotídicas absorvem luz UV, e os ácidos nucleicos são caracterizados por uma forte absorção em comprimentos de onda próximos a 260 nm (**Figura 8-10**).

Lactâmico ⇌ Lactímico ⇌ Lactímico duplo
Uracila

**FIGURA 8-9 Formas tautoméricas da uracila.** A forma lactâmica predomina em pH 7,0; as outras formas tornam-se mais proeminentes quando o pH diminui. As outras pirimidinas livres e as purinas livres também têm formas tautoméricas, mas são mais raramente encontradas.

As bases púricas e pirimídicas são hidrofóbicas e relativamente insolúveis em água perto do pH neutro da célula. Em pH ácido ou alcalino, as bases tornam-se carregadas e sua solubilidade em água aumenta. Interações de empilhamento hidrofóbicas em que duas ou mais bases são posicionadas com os planos de seus anéis em paralelo (como pilha de moedas) são uma das duas formas mais importantes de interação entre bases nos ácidos nucleicos. O empilhamento também envolve a combinação de interações dipolo-dipolo e de van der Waals entre as bases. O empilhamento de bases ajuda a minimizar o contato das bases com a água e interações de empilhamento de bases são muito importantes na estabilização da estrutura tridimensional dos ácidos nucleicos, como descrito posteriormente.

Os grupos funcionais das purinas e das pirimidinas são anéis nitrogenados, grupos carbonila e grupos amino exocíclicos. As ligações de hidrogênio envolvendo os grupos amino e carbonila são a forma mais importante de interação entre duas (e ocasionalmente três ou quatro) cadeias com-

**FIGURA 8-10 Espectro de absorção dos nucleotídeos comuns.** Os espectros são mostrados de acordo com a variação nos coeficientes de extinção molar pelo comprimento de onda. Os coeficientes de extinção molar em 260 nm e pH 7,0 ($\varepsilon_{260}$) estão listados na tabela. Os espectros dos ribonucleotídeos e desoxirribonucleotídeos correspondentes, assim como os nucleosídeos, são essencialmente idênticos. Para misturas de nucleotídeos, o comprimento de onda de 260 nm (linha vertical tracejada) é usado para medidas de absorção.

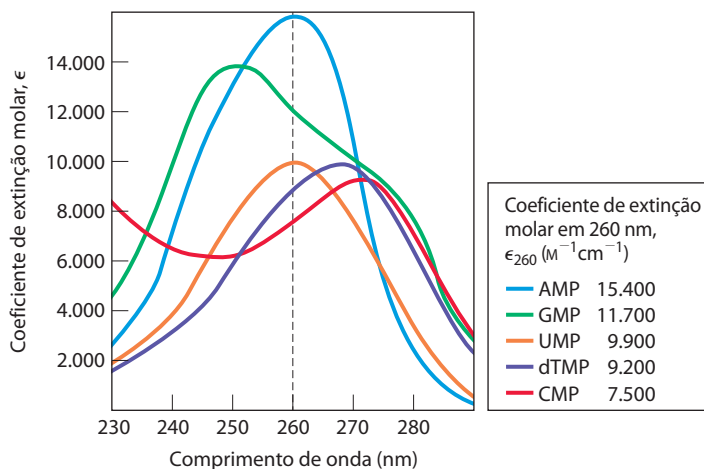
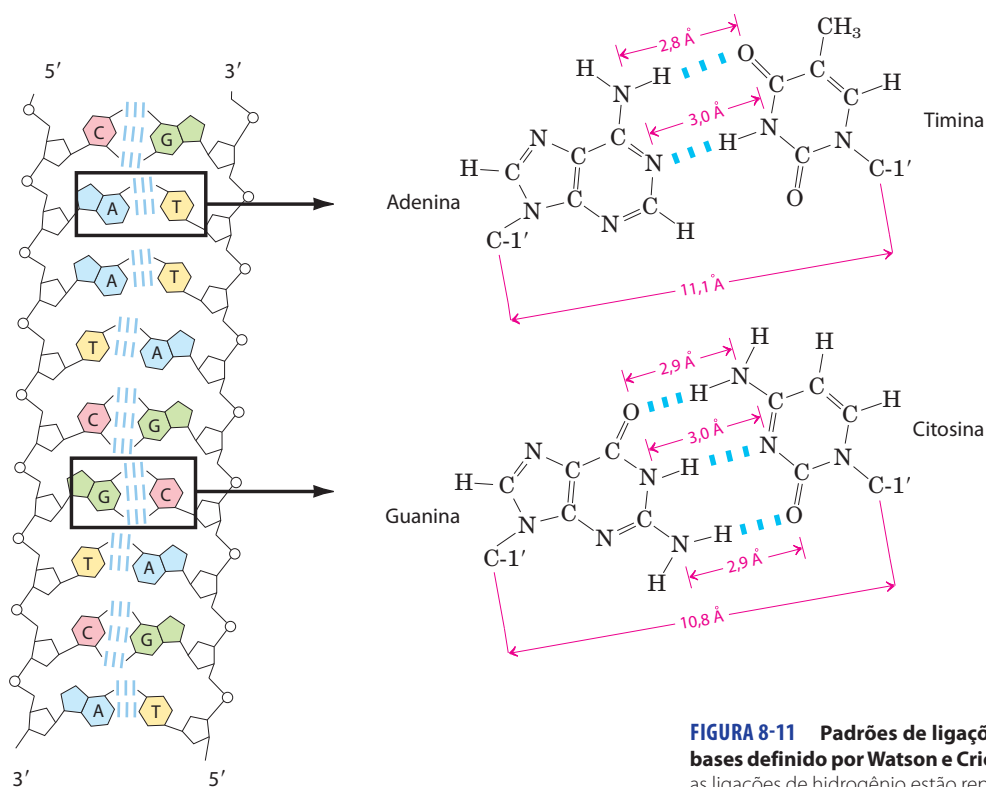



**FIGURA 8-11 Padrões de ligações de hidrogênio no pareamento de bases definido por Watson e Crick.** Aqui, como em outras partes no livro, as ligações de hidrogênio estão representadas por três linhas azuis.

plementares de ácidos nucleicos. Os padrões mais comuns de ligações de hidrogênio são aqueles definidos por James D. Watson e Francis Crick em 1953, nos quais A liga-se especificamente a T (ou U) e G liga-se a C (**Figura 8-11**). Esses dois tipos de **pares de bases** predominam no DNA de fita dupla e no RNA e os tautômeros mostrados na Figura 8-2 são responsáveis por esses padrões. É esse pareamento específico de bases que permite a duplicação da informação genética, como será discutido posteriormente neste capítulo.

James D. Watson

Francis Crick, 1916-2004

## RESUMO 8.1 Alguns dados básicos

- Um nucleotídeo é constituído por uma base nitrogenada (purina ou pirimidina), um açúcar pentose e um ou mais grupos fosfato. Os ácidos nucleicos são polímeros de nucleotídeos, unidos por ligações fosfodiéster entre o grupo 5′-hidroxila de uma pentose e o grupo 3′-hidroxila da próxima pentose.
- Existem dois tipos de ácidos nucleicos: RNA e DNA. Os nucleotídeos no RNA contêm ribose e as bases pirimídicas comuns são a uracila e a citosina. No DNA, os nucleotídeos contêm 2′-desoxirribose e as bases pirimídicas comuns são a timina e a citosina. As purinas primárias são adenina e guanina tanto no RNA quanto no DNA.

## 8.2 Estrutura dos ácidos nucleicos

A descoberta da estrutura do DNA por Watson e Crick em 1953 deu origem a disciplinas completamente novas e influenciou o rumo de muitas já estabelecidas. Nesta seção, o foco principal será a estrutura do DNA, alguns dos eventos que conduziram para a sua descoberta e aprimoramentos mais recentes na nossa compreensão do DNA. A estrutura do RNA também é apresentada.

Como no caso da estrutura proteica (Capítulo 4), muitas vezes é útil descrever a estrutura de ácidos nucleicos em termos de níveis de complexidade hierárquicos (primário, secundário, terciário). A estrutura primária dos ácidos nucleicos é sua estrutura covalente e sequência nucleotídica. Qualquer estrutura regular e estável adotada por alguns ou todos os nucleotídeos em um ácido nucleico pode ser considerada como estrutura secundária. Todas as estruturas consideradas no restante deste capítulo se classificam como estruturas secundárias. O enovelamento complexo de grandes cromossomos dentro da cromatina eucariótica e o nucleoide bacteriano ou o elaborado enovelamento de

grandes moléculas de tRNA ou rRNA geralmente são considerados estruturas terciárias. A estrutura terciária do DNA é discutida no Capítulo 24 e a estrutura terciária do RNA é considerada no Capítulo 26.

## O DNA é uma dupla-hélice que armazena informação genética

O DNA foi inicialmente isolado e caracterizado por Friedrich Miescher em 1868. Ele chamou a substância contendo fósforo de "nucleína". Até os anos de 1940, com o trabalho de Oswald T. Avery, Colin MacLeod e Maclyn McCarty, não existia uma evidência convincente de que o DNA fosse o material genético. Avery e seus colegas descobriram que DNA extraído de uma linhagem virulenta (patogênica) da bactéria *Streptococcus pneumoniae* e injetado em uma linhagem não virulenta da mesma bactéria transformava a linhagem não virulenta em virulenta. Eles concluíram que o DNA da linhagem virulenta carregava a informação genética para virulência. Então, em 1952, experimentos de Alfred D. Hershey e Martha Chase, que estudaram a infecção de células bacterianas por um vírus (bacteriófago), com DNA ou proteína marcados radioativamente, acabaram qualquer dúvida remanescente de que o DNA, e não a proteína, portava a informação genética.

Outra pista importante para a estrutura do DNA veio do trabalho de Erwin Chargaff e seus colegas no final dos anos de 1940. Eles descobriram que as quatro bases nucleotídicas do DNA eram encontradas em proporções diferentes nos DNAs de organismos diferentes e que as quantidades de certas bases estavam relacionadas. Esses dados, coletados a partir de DNAs de uma variedade muito grande de espécies, conduziram Chargaff às seguintes conclusões:

1. A composição de bases do DNA, em geral, varia de uma espécie para a outra.
2. Amostras de DNA isoladas de diferentes tecidos da mesma espécie têm a mesma composição de bases.
3. A composição de bases de DNA em uma dada espécie não muda com a idade do organismo, seu estado nutricional ou a mudança de ambiente.
4. Em todos os DNAs celulares, independentemente da espécie, o número de resíduos da adenosina é igual ao número de resíduos da timidina (isto é, A = T) e o número de resíduos de guanosina é igual ao número de resíduos de citidina (G = C). Dessas correlações, conclui-se que a soma dos resíduos de purina é igual à soma dos resíduos de pirimidina; isto é, A + G = T + C.

Essas relações quantitativas, algumas vezes denominadas "regras de Chargaff", foram confirmadas por muitos outros pesquisadores. Elas foram a chave para estabelecer a estrutura tridimensional do DNA e para levantar pistas da forma como a informação genética está codificada no DNA e é transmitida de uma geração para a outra.

Para esclarecer melhor sobre a estrutura do DNA, Rosalind Franklin e Maurice Wilkins usaram o método eficaz da difração por raios X (ver Quadro 4-5) para analisar fibras de DNA. Eles demonstraram, no início dos anos de 1950, que o DNA produz um padrão de difração por raios X característico (**Figura 8-12**). A partir desse padrão, deduziu-se que as moléculas de DNA são helicoidais com duas periodicidades ao longo de seu eixo mais longo, a primária de 3,4 Å e a secundária de 34 Å. O problema então era propor o modelo tridimensional de uma molécula de DNA que pudesse ser compatível não apenas com os dados de difração de raios X, mas também com a equivalência de bases A═T e G═C específica descoberta por Chargaff e com as outras propriedades químicas do DNA.

**FIGURA 8-12 Padrão de difração por raios X de fibras do DNA.** As marcas formando uma cruz no centro demonstram a estrutura helicoidal. As bandas pesadas na esquerda e na direita originam-se das bases recorrentes.

Rosalind Franklin, 1920-1958

Maurice Wilkins, 1916-2004

James Watson e Francis Crick contaram com essas informações acumuladas sobre o DNA para deduzir sua estrutura. Em 1953, eles postularam o modelo tridimensional da estrutura do DNA que levava em consideração todos as dados disponíveis. O modelo consiste em duas cadeias de DNA helicoidais enroladas em torno do mesmo eixo para formar uma dupla-hélice de orientação à direita (ver no Quadro 4-1 uma explicação sobre a orientação à direita e à esquerda da estrutura helicoidal). Os esqueletos hidrofílicos de grupos fosfato e desoxirribose alternados estão no lado de fora da dupla-hélice, orientados para a água circundante. O anel furanosídico de cada desoxirribose está na conformação C-2′ endo. As bases pirimídicas e púricas das duas fitas estão empilhadas dentro da dupla-hélice, com suas estruturas hidrofóbicas em forma de anel e quase planares muito perto uma da outra e perpendiculares ao eixo longitudinal. O pareamento perfeito das duas fitas cria um **sulco maior** e um

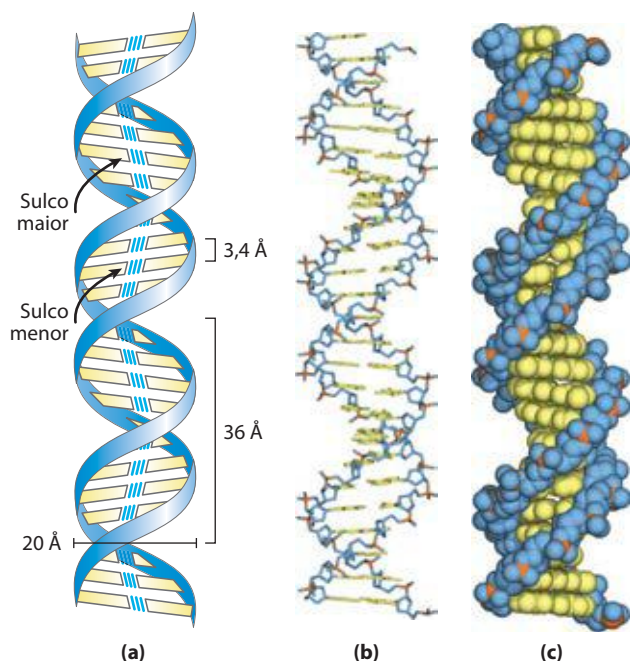



**FIGURA 8-13 Modelo de Watson-Crick para a estrutura do DNA.** O modelo original proposto por Watson e Crick tinha 10 pares de bases ou 34 Å (3,4 nm) por volta da hélice; medidas subsequentes revelaram 10,5 pares de bases ou 36 Å (3,6 nm) por volta. **(a)** Representação esquemática, mostrando as dimensões da hélice. **(b)** Representação em bastão mostrando o esqueleto e o empilhamento de bases. **(c)** Modelo de volume atômico.

**sulco menor** na superfície do duplex (**Figura 8-13**). Cada base nucleotídica de uma fita está pareada no mesmo plano com a base da outra fita. Watson e Crick descobriram que os pares de bases unidos por ligações de hidrogênio de G com C e de A com T, mostrados na Figura 8-11, são aqueles que melhor se enquadram dentro da estrutura, fornecendo uma base lógica para a regra de Chargaff que, em qualquer DNA, G = C e A = T. É importante notar que podem ser formadas três ligações de hidrogênio entre G e C, simbolizadas G≡C, mas apenas duas podem ser formadas entre A e T, simbolizadas A═T. Essa é uma razão para a descoberta de que a separação das fitas pareadas do DNA é mais difícil quanto maior for a razão do pareamento de bases G≡C para A═T. Outros pareamentos de bases tendem (em vários graus) a desestabilizar a estrutura dupla helicoidal.

Quando Watson e Crick construíram seu modelo, eles tiveram que decidir inicialmente se as fitas de DNA seriam **paralelas** ou **antiparalelas** – se suas ligações fosfodiéster 3′,5′ iriam seguir no mesmo sentido ou em sentidos opostos. Uma orientação antiparalela produziu o modelo mais convincente e trabalhos posteriores com DNA-polimerases (Capítulo 25) produziram evidências experimentais de que as fitas eram mesmo antiparalelas, um achado confirmado posteriormente por análise de raios X.

Para explicar a periodicidade nos padrões de difração de raios X das fibras de DNA, Watson e Crick manipularam modelos moleculares para chegar à estrutura em que a distância entre as bases empilhadas verticalmente no interior da dupla-hélice seria de 3,4 Å; uma distância de repetição secundária de aproximadamente 34 Å foi atribuída para a presença de 10 pares de bases em cada volta completa da dupla-hélice. Em solução aquosa, a estrutura é um pouco diferente daquela nas fibras, havendo 10,5 pares de bases por volta helicoidal (Figura 8-13).

Como mostra a **Figura 8-14**, as duas cadeias polinucleotídicas antiparalelas da dupla-hélice de DNA não são idênticas nem na sua sequência de bases e nem na sua composição. Elas são **complementares** entre si. Sempre que a adenina está presente em uma cadeia, a timina é encontrada na outra; da mesma forma, sempre que a guanina está presente em uma cadeia, a citosina é encontrada na outra.

A dupla-hélice de DNA, ou duplex, é mantida por duas forças, como descrito anteriormente: ligações de hidrogênio entre os pares de bases complementares (Figura 8-11) e interações de empilhamento de bases. A complementaridade entre as cadeias de DNA é atribuída à ligação de hidrogênio entre os pares de bases. As interações de empilhamento de bases, as quais são muito inespecíficas no que diz respeito à identidade das bases empilhadas, determinam a maior contribuição para a estabilidade da dupla-hélice.

Os aspectos importantes do modelo da dupla-hélice da estrutura do DNA são mantidos, em grande parte, por evidências biológicas e químicas. Além disso, o modelo sugere imediatamente um mecanismo para a transmissão da informação genética. O aspecto principal do modelo é a complementaridade das duas cadeias de DNA. Como Watson e Crick foram capazes de visualizar, muito antes da disponibilidade de dados confirmatórios, essa estrutura poderia ser replicada de forma lógica pela (1) separação das duas cadeias e (2) síntese de uma cadeia complementar a cada uma delas. Uma vez que, em cada nova cadeia, os nucleotídeos são unidos na sequência especificada pelas regras de pareamento de bases descritas anteriormente, cada cadeia preexistente funciona

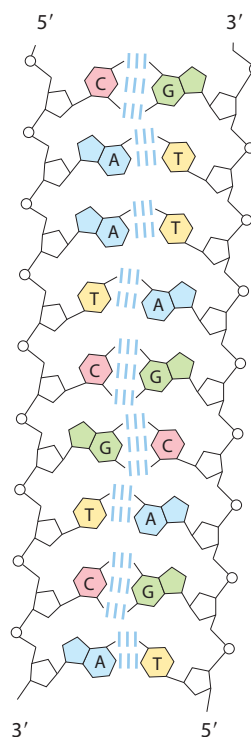



**FIGURA 8-14 Complementaridade das cadeias na dupla-hélice de DNA.** As cadeias antiparalelas complementares do DNA seguem as regras propostas por Watson e Crick. As cadeias antiparalelas pareadas por bases são diferentes na sua composição de bases: a cadeia da esquerda tem a composição $A_3T_2G_1C_3$; a da direita, $A_2T_3G_3C_1$. Elas também se diferenciam na sequência quando cada cadeia é lida na direção 5′ → 3′. Observe as equivalências de bases: A = T e G = C no duplex.

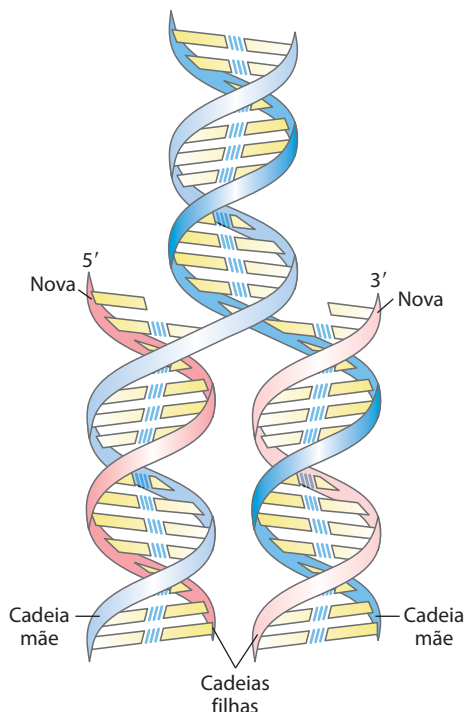



**FIGURA 8-15 Replicação do DNA como sugerido por Watson e Crick.** As "cadeias mãe" ou preexistentes são separadas e cada uma é o molde para a biossíntese de uma "cadeia filha" complementar (em cor-de-rosa).

como molde para direcionar a síntese de uma cadeia complementar (**Figura 8-15**). Essas suposições foram confirmadas experimentalmente, inaugurando uma revolução da nossa compreensão da hereditariedade biológica.

**PROBLEMA RESOLVIDO 8-1** **Pareamento de bases no DNA**

Em amostras de DNA isoladas de duas espécies de bactérias não identificadas, X e Y, adenina constitui 32 e 17%, respectivamente, do total de bases. Que proporção relativa de adenina, guanina, timina e citosina você esperaria encontrar nas duas amostras de DNA? Que suposições você fez? Uma dessas espécies foi isolada de uma fonte de água quente (64°C). Qual espécie é a mais provável de ser uma bactéria termofílica e por quê?

**Solução:** Para qualquer dupla-hélice de DNA, A = T e G = C. O DNA da espécie X tem 32% de A e, portanto, deve conter 32% de T. Isso totaliza 64% das bases e deixa 36% para pareamento G≡C: 18% de G e 18% de C. A amostra da espécie Y, com 17% de A, deve conter 17% de T, totalizando 34% dos pares de bases. Os 66% restantes de bases são então distribuídos igualmente assumindo que ambas as moléculas de DNA estão na forma de dupla-hélice.

Quanto maior o conteúdo G + C da molécula de DNA, maior é a temperatura de fusão. A espécie Y, como apresenta o DNA com o maior conteúdo G + C (66%), é a bactéria termofílica mais provável; seu DNA tem a maior temperatura de fusão e, portanto, é mais estável na temperatura da fonte de água quente.

## O DNA pode ocorrer em formas tridimensionais diferentes

O DNA é uma molécula extremamente flexível. Rotação considerável é possível em torno de vários tipos de ligações no esqueleto açúcar-fosfato (fosfodesoxirribose) e flutuação térmica pode produzir enovelamento, alongamento e desnaturação (fusão) das cadeias. Muitas variações significativas da estrutura de DNA de Watson e Crick são encontradas no DNA celular, algumas ou todas elas podem ser importantes no metabolismo de DNA. Essas variações estruturais geralmente não afetam as propriedades-chave do DNA descritas por Watson e Crick: complementaridade das cadeias, cadeias antiparalelas e a exigência do pareamento A═T e G≡C.

Variação estrutural no DNA reflete três aspectos: as diferentes conformações possíveis da desoxirribose, a rotação em torno das ligações contíguas que constituem o esqueleto de fosfodesoxirribose (**Figura 8-16a**) e a rotação livre em torno da ligação C-1′-*N*-glicosídica (Figura 8-16b). Devido a restrições estéricas, as purinas nos nucleotídeos púricos estão restritas a duas conformações estáveis com respeito à desoxirribose, denominadas *syn* e *anti* (Figura 8-16b). As pirimidinas geralmente estão restritas à conformação *anti*, devido a interferências estéricas entre o açúcar e o oxigênio da carbonila no C-2 da pirimidina.

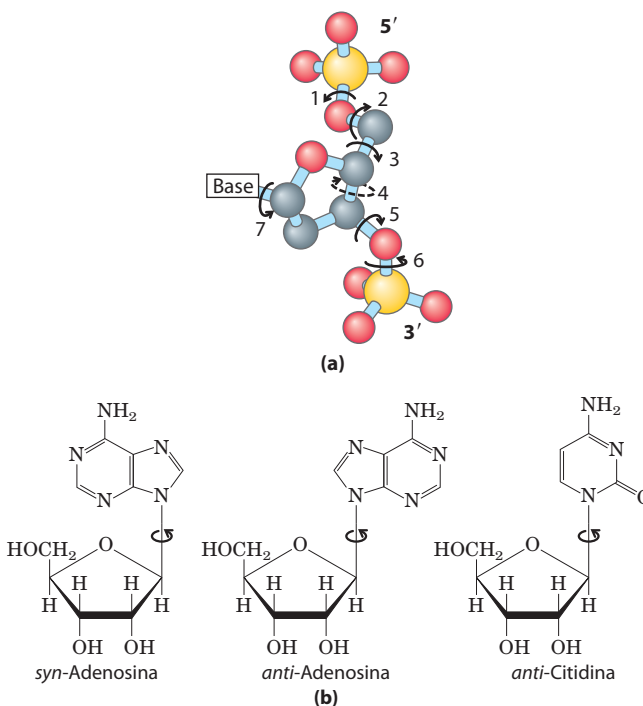



**FIGURA 8-16 Variação estrutural no DNA. (a)** A conformação de um nucleotídeo no DNA é afetada pela rotação de aproximadamente sete ligações diferentes. Seis dessas ligações giram livremente. Uma rotação limitada da ligação 4 origina uma dobra no anel. Essa conformação é endo ou exo, dependendo se o átomo encontra-se no mesmo lado do plano como C-5′ ou no lado oposto (ver Figura 8-3b). **(b)** Para bases púricas nos nucleotídeos, apenas duas conformações relacionadas às unidades de ribose ligadas são permitidas estericamente, *anti* ou *syn*. As pirimidinas ocorrem na conformação *anti*.

A estrutura de Watson e Crick também é conhecida como **forma B do DNA** ou B-DNA. A forma B é a estrutura mais estável para uma molécula de DNA de sequência aleatória sob condições fisiológicas, sendo, desta forma, o ponto de referência padrão em qualquer estudo das propriedades do DNA. Duas variantes estruturais que tiveram suas estruturas cristalográficas bem caracterizadas são as **formas A** e **Z**. Essas três conformações de DNA estão mostradas na **Figura 8-17**, com um resumo das suas propriedades. A forma A é favorecida em muitas soluções que são relativamente livres de água. O DNA é ainda organizado na forma de dupla-hélice à direita, mas a hélice é mais larga e o número de bases por volta helicoidal é 11, em vez de 10,5 como no B-DNA. O plano dos pares de bases no A-DNA está inclinado em cerca de 20º relativo aos pares de bases do B-DNA, então os pares de bases no A-DNA não estão perfeitamente perpendiculares ao eixo da hélice. Essas mudanças estruturais aprofundam o sulco maior enquanto fazem o sulco menor mais superficial. Os reagentes usados para promover cristalização de DNA tendem a desidratá-lo, e assim a maioria das moléculas de DNA pequenas tende a cristalizar na forma A.

A forma Z do DNA é um afastamento mais radical da estrutura B; a diferença mais óbvia é a rotação helicoidal à esquerda. Nessa forma são encontrados 12 pares de bases por volta helicoidal, e a estrutura aparece mais delgada e alongada. O esqueleto de DNA adquire uma aparência de ziguezague. Certas sequências nucleotídicas dobram em hélices Z à esquerda muito mais facilmente que outras. Exemplos eminentes são sequências em que pirimidinas alternam com purinas, especialmente alternando resíduos de C e G ou 5-metil-C e G. Para formar a hélice à esquerda no Z-DNA, os resíduos púricos mudam para a conformação *syn*, alternando com pirimidinas na conformação *anti*. O sulco maior é pouco aparente no Z-DNA, e o o sulco menor é estreito e profundo.

A ocorrência do A-DNA em células é duvidosa, mas existem evidências para algumas pequenas extensões (trechos) do Z-DNA em bactérias e em eucariotos. Esses trechos de Z-DNA podem ter um papel (até agora não definido) na regulação da expressão de alguns genes ou em recombinação genética.

## Certas sequências de DNA adotam estruturas incomuns

Outras variações estruturais dependentes de sequência encontradas em cromossomos grandes podem afetar a função e o metabolismo dos segmentos de DNA em suas adjacências. Por exemplo, ocorrem curvaturas na hélice de DNA sempre que quatro ou mais resíduos de adenosina aparecem sucessivamente em uma cadeia. Seis adenosinas, uma após a outra, produzem uma curvatura de cerca de 18º. A curvatura observada nessa e em outras sequências pode ser importante na ligação de algumas proteínas ao DNA.

Um tipo de sequência de DNA bem comum é um **palíndromo**. Um palíndromo é uma palavra ou frase escrita de forma idêntica se for lida da esquerda para a direita ou vice-versa; dois exemplos são OMISSÍSSIMO e LUZ AZUL. O termo é aplicado a regiões de DNA com **repetições invertidas** de sequências de bases tendo simetria dupla

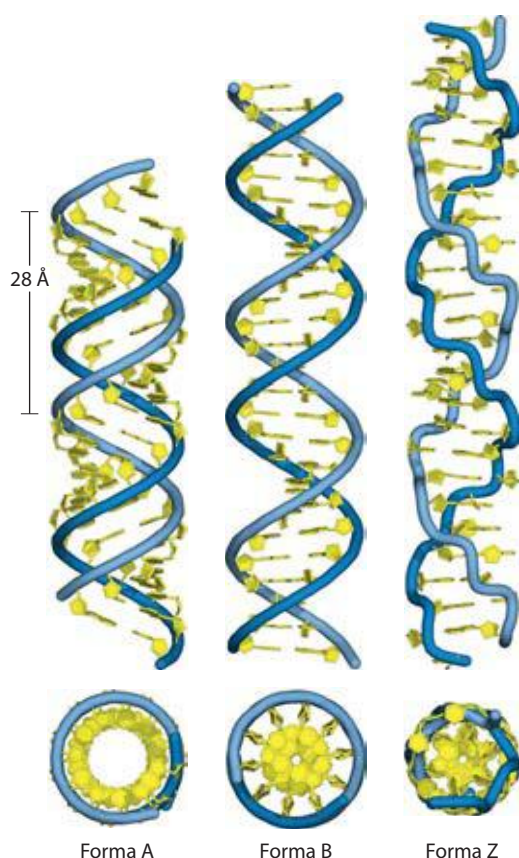



**FIGURA 8-17 Comparação das formas A, B e Z do DNA.** Cada estrutura mostrada aqui tem 36 pares de bases. As riboses e as bases estão em amarelo. O esqueleto fosfodiéster está representado como uma corda azul. Azul é a cor usada para representar cadeias de DNA nos capítulos seguintes. A tabela resume algumas propriedades das três formas do DNA.

| | Forma A | Forma B | Forma C |
|---|---|---|---|
| Orientação da hélice | À direita | À direita | À esquerda |
| Diâmetro | ~26 Å | ~20 Å | ~18 Å |
| Pares de bases por volta helicoidal | 11 | 10,5 | 12 |
| Incremento na hélice por par de bases | 2,6 Å | 3,4 Å | 3,7 Å |
| Torção da hélice por volta helicoidal | 20° | 6° | 7° |
| Conformação do anel de ribose | C-3′ endo | C-2′ endo | C-2′ endo em pirimidinas; C-3′ endo em purinas |
| Conformação da ligação glicosídica | *Anti* | *Anti* | *Anti* em pirimidinas; *syn* em purinas |

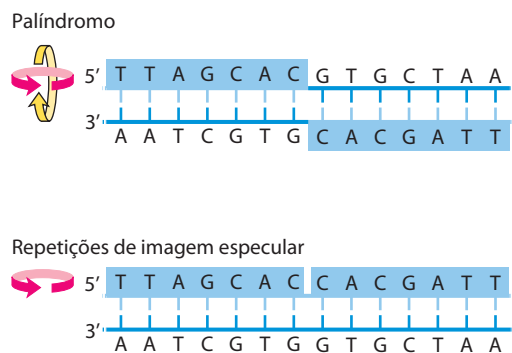



**FIGURA 8-18 Palíndromos e repetições de imagem especular.** Palíndromos são sequências de ácidos nucleicos de fita dupla com simetria dupla. A fim de sobrepor uma repetição (sequência sombreada) na outra, ela deve ser girada 180º em torno do eixo horizontal e então 180º em torno do eixo vertical, como mostrado pelas setas coloridas. Uma repetição de imagem especular, por outro lado, tem uma sequência simétrica dentro de cada cadeia. Sobrepor uma repetição na outra requer apenas uma única rotação de 180º em torno do eixo vertical.

nas duas cadeias de DNA (**Figura 8-18**). Tais sequências são autocomplementares dentro de cada cadeia e, consequentemente, têm potencial para formar estruturas **cruciformes** (em formato de cruz) ou em **grampo** (**Figura 8-19**). Quando a repetição invertida ocorre dentro de cada cadeia individual de DNA, a sequência é denominada **repetição de imagem especular**. As repetições de imagem especular não têm sequências complementares dentro da mesma cadeia e não formam grampos ou estruturas cruciformes. Sequências desses tipos são encontradas em praticamente cada grande molécula de DNA e podem abranger poucos pares de bases ou milhares. O número de palíndromos que ocorrem como cruciformes em células não é conhecido, embora algumas estruturas cruciformes tenham sido demonstradas *in vivo* em *Escherichia coli*. As sequências autocomplementares produzem enovelamentos de cadeias simples de DNA (ou RNA) isoladas em solução para se dobrar em estruturas complexas contendo múltiplos grampos.

Algumas estruturas de DNA incomuns envolvem três ou até mesmo quatro cadeias de DNA. Os nucleotídeos participantes de um par de bases do tipo Watson-Crick (Figura 8-11) podem formar ligações de hidrogênio adicionais, especialmente com grupos funcionais ancorados no sulco maior. Por exemplo, um resíduo de citidina (se protonado) pode parear com o resíduo de guanina de um par nucleotídico G≡C (**Figura 8-20**); uma timidina pode parear com a adenosina de um par A═T. O N-7, o $O^6$ e o $N^6$ das purinas, os átomos que participam na ligação de hidrogênio do triplex de DNA frequentemente são denominados **posições de Hoogsteen**, e o pareamento do tipo não Watson-Crick é chamado de **pareamento de Hoogsteen**, em homenagem a Karst Hoogsteen, que em 1963 reconheceu pela primeira vez o potencial desses pareamentos incomuns. O pareamento de Hoogsteen permite a formação de **triplex de DNA**. Os triplex mostrados na Figura 8-20 (a, b) são mais estáveis em pH baixo porque o trio C≡G · $C^+$ requer uma citosina protonada. No triplex, o $pK_a$ dessa citosina é $> 7{,}5$, diferente do seu valor normal de 4,2. Os triplex também se

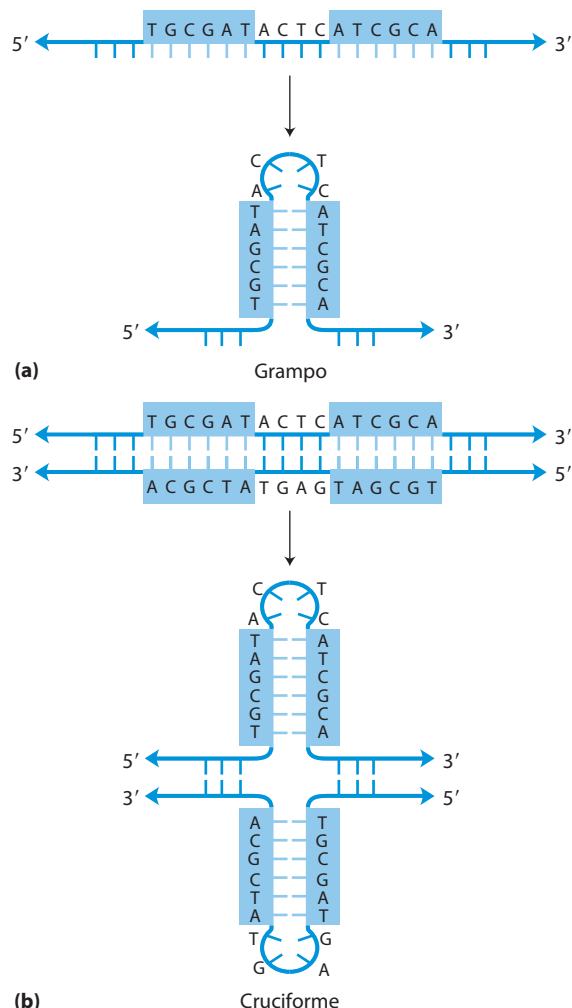



**FIGURA 8-19 Grampos e estruturas cruciformes.** Sequências de DNA (ou RNA) palindrômicas podem formar estruturas alternativas com pareamento de bases intracadeia. **(a)** Quando somente uma única cadeia de DNA (ou RNA) está envolvida, a estrutura é chamada de grampo. **(b)** Quando ambas as cadeias do duplex de DNA estão envolvidas, a estrutura é denominada cruciforme. O sombreamento azulado realça sequências assimétricas que podem parear com sequências complementares tanto na mesma cadeia quanto na cadeia complementar.

formam mais facilmente em sequências longas contendo somente pirimidinas ou somente purinas em uma dada cadeia. Alguns triplex de DNA contêm duas cadeias púricas e uma cadeia pirimídica; outros contêm duas cadeias púricas e uma cadeia pirimídica.

Quatro cadeias de DNA também podem parear para formar um tetraplex (quadruplex), mas isso ocorre facilmente apenas para sequências de DNA com uma proporção muito alta de resíduos de guanosina (Figura 8-20c, d). O tetraplex da guanosina, ou **tetraplex G**, é bastante estável em uma faixa ampla de condições. A orientação das cadeias em um tetraplex pode variar como mostrado na Figura 8-20e.

No DNA de células vivas, sítios reconhecidos por muitas proteínas ligantes de DNA em sequências específicas (Capítulo 28) estão organizados como palíndromos, e sequências polipirimídicas ou polipúricas que podem formar hélices triplas são encontradas dentro de regiões envolvi-

T=A•T

C≡G•C+

(a)

Tetraplex de guanosina

(b) (c) (d)

Paralela

Antiparalela

(e)

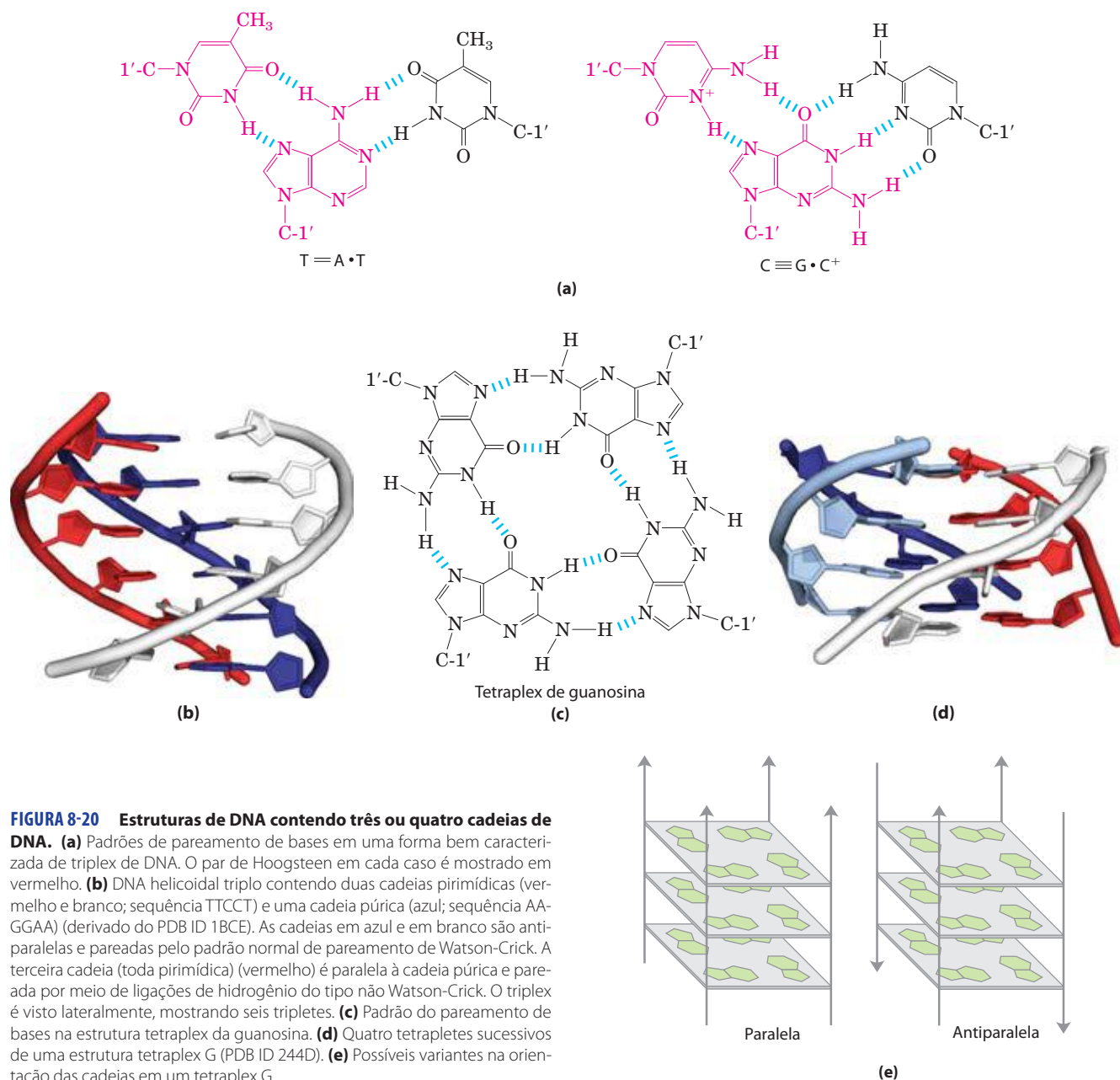



**FIGURA 8-20 Estruturas de DNA contendo três ou quatro cadeias de DNA. (a)** Padrões de pareamento de bases em uma forma bem caracterizada de triplex de DNA. O par de Hoogsteen em cada caso é mostrado em vermelho. **(b)** DNA helicoidal triplo contendo duas cadeias pirimídicas (vermelho e branco; sequência TTCCT) e uma cadeia púrica (azul; sequência AAGGAA) (derivado do PDB ID 1BCE). As cadeias em azul e em branco são antiparalelas e pareadas pelo padrão normal de pareamento de Watson-Crick. A terceira cadeia (toda pirimídica) (vermelho) é paralela à cadeia púrica e pareada por meio de ligações de hidrogênio do tipo não Watson-Crick. O triplex é visto lateralmente, mostrando seis tripletes. **(c)** Padrão do pareamento de bases na estrutura tetraplex da guanosina. **(d)** Quatro tetrapletes sucessivos de uma estrutura tetraplex G (PDB ID 244D). **(e)** Possíveis variantes na orientação das cadeias em um tetraplex G.

das na regulação de expressão de alguns genes eucarióticos. A princípio, cadeias de DNA sintéticas desenhadas para parear com essas sequências para formar triplex de DNA podem interromper a expressão gênica. Essa abordagem para controlar o metabolismo celular é de interesse comercial pela sua potencial aplicação na medicina e na agricultura.

## RNAs mensageiros codificam para cadeias polipeptídicas

Agora o foco será a expressão da informação genética que o DNA contém. O RNA, a segunda maior forma de ácidos nucleicos nas células, tem muitas funções. Na expressão gênica, o RNA atua como intermediário pelo uso da informação codificada no DNA para especificar a sequência de aminoácidos da proteína funcional.

Uma vez que o DNA de eucariotos é basicamente confinado no núcleo, enquanto a síntese proteica ocorre nos ribossomos no citoplasma, alguma outra molécula que não o DNA deve carregar a mensagem genética do núcleo para o citoplasma. Já por volta da década de 1950, o RNA foi considerado o candidato lógico: o RNA é encontrado tanto no núcleo quanto no citoplasma e um aumento na síntese proteica é acompanhado por um aumento na quantidade de RNA citoplásmico e um aumento da sua taxa de renovação. Essas e outras observações levaram vários pesquisadores a sugerir que o RNA carrega a informação genética do DNA para a maquinaria biossintética proteica do ribossomo. Em 1961, François Jacob e Jacques Monod apresentaram uma descrição consistente (e essencialmente correta) de muitos aspectos desse processo. Eles propuseram o nome "RNA

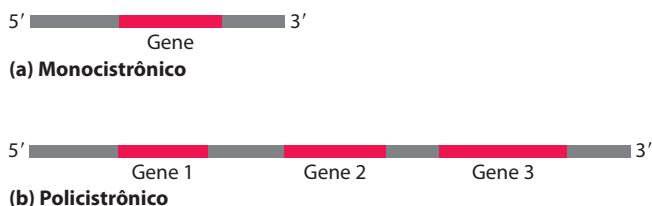



**FIGURA 8-21 mRNA bacteriano.** Diagrama esquemático mostrando mRNA **(a)** monocistrônico e **(b)** policistrônico de bactérias. Segmentos em vermelho representam RNA que codifica para um produto gênico; segmentos em cinza representam RNA não codificante. No transcrito policistrônico, o RNA não codificante separa os três genes.

mensageiro" (mRNA) para aquela porção do RNA celular total que carrega a informação genética do DNA para os ribossomos, onde os mensageiros fornecem os moldes que especificam as sequências de aminoácidos nas cadeias polipeptídicas. Embora os mRNAs de diferentes genes possam variar muito em tamanho, os mRNAs de um gene em particular geralmente têm um tamanho definido. O processo de formação de um mRNA a partir de um molde de DNA é conhecido como **transcrição**.

Em bactérias e arquibactérias, uma única molécula de mRNA pode codificar para uma ou várias cadeias polipeptídicas. Se ela carrega o código para somente um polipeptídeo, o mRNA é **monocistrônico**; se ela codifica para dois ou mais polipeptídeos diferentes, o mRNA é **policistrônico**. Em eucariotos, a maioria dos mRNAs é monocistrônica. (Para a finalidade dessa discussão, "cistron" refere-se a um gene. O termo por si só tem raízes históricas na ciência da genética e sua definição genética formal vai além do escopo deste texto.) O comprimento mínimo de um mRNA é determinado pelo comprimento da cadeia polipeptídica para a qual ele codifica. Por exemplo, uma cadeia polipeptídica de 100 resíduos de aminoácidos requer uma sequência codificante de RNA de pelo menos 300 nucleotídeos, porque cada aminoácido é codificado por um grupo de três nucleotídeos (este e outros detalhes de síntese proteica serão discutidos no Capítulo 27). Entretanto, mRNAs transcritos a partir de DNA são sempre um pouco mais longos que o comprimento necessário para a codificação simples de uma sequência (ou sequências) polipeptídica. A porção adicional não codificante do RNA inclui sequências que regulam a síntese proteica. A **Figura 8-21** resume a estrutura geral de mRNAs bacterianos.

## Muitos RNAs têm estruturas tridimensionais mais complexas

O RNA mensageiro é somente uma de várias classes de RNA celular. RNAs transportadores são moléculas adaptadoras na síntese proteica; ligadas covalentemente a um aminoácido em uma extremidade, elas pareiam com um mRNA de forma que os aminoácidos são unidos a um polipeptídeo crescente na sequência correta. RNAs ribossômicos são componentes dos ribossomos. Existe também uma grande variedade de RNA de função especial, incluindo alguns (chamados ribozimas) que têm atividade enzimática. Todos os RNAs serão considerados detalhadamente no Capítulo 26. As funções diversas e muitas vezes complexas desses RNAs refletem a diversidade de uma estrutura muito mais rica do que a observada em moléculas de DNA.

O produto de transcrição do DNA é sempre RNA de fita simples. A cadeia simples tende a assumir a conformação helicoidal à direita dominada por interações de empilhamento de bases (**Figura 8-22**), as quais são mais fortes entre duas purinas do que entre uma purina e uma pirimidina ou entre duas pirimidinas. A interação purina-purina é tão forte que uma pirimidina separando duas purinas é muitas vezes deslocada do padrão de empilhamento, de forma que as purinas possam interagir. Qualquer sequência autocomplementar na molécula produz estruturas mais complexas. O RNA pode fazer pareamento de bases com regiões complementares de RNA ou de DNA. O pareamento de bases é igual ao padrão para DNA: G pareia com C e A pareia com U (ou com o ocasional resíduo de T em alguns RNA). Uma diferença é que o pareamento de bases entre resíduos de G e U – incomum no DNA – é permitido no RNA (ver Figura 8-24), quando sequências complementares nas duas cadeias simples de RNA pareiam uma com a outra. As cadeias pareadas no RNA ou nos duplex RNA-DNA são antiparalelas, como no DNA.

Quando duas cadeiras de RNA com sequências perfeitamente complementares estão pareadas, a estrutura predominante de cadeia dupla é uma dupla-hélice de forma A à direita. As estruturas tridimensionais de muitos RNAs, como aquelas das proteínas, são complexas e únicas. Interações fracas, especialmente interações de empilhamento, ajudam a estabilizar as estruturas de RNA, assim como elas fazem no DNA. Hélices na forma Z foram feitas em laboratório (sob condições de alta salinidade e alta temperatura). A forma B do RNA ainda não foi observada. Quebras na hélice normal de forma A causadas pelo pareamento incorreto

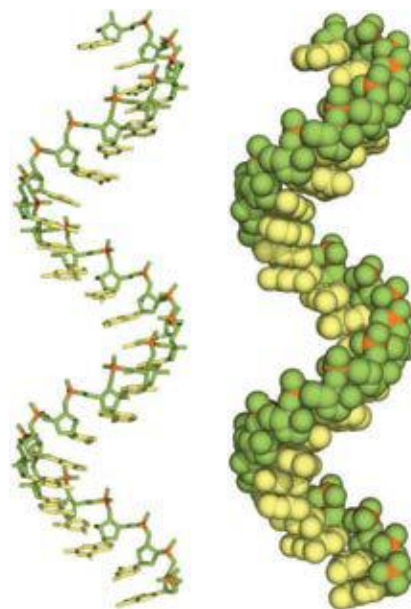



**FIGURA 8-22 Padrão típico de empilhamento à direita de RNA de fita simples.** As bases estão mostradas em amarelo, os átomos de fosfato em cor de laranja e as riboses e os oxigênios dos fosfatos em verde. Verde é usado para representar cadeias de RNA nos capítulos seguintes, assim como azul é usado para o DNA.

ou não pareamento de bases em uma ou ambas as cadeias são comuns e resultam em protuberâncias ou alças internas (**Figura 8-23**). Alças do tipo grampos formam-se entre sequências autocomplementares (palindrômicas) vizinhas. O potencial para estruturas helicoidais de pareamento de bases em muitos RNAs é muito grande (**Figura 8-24**) e os grampos resultantes são o tipo mais comum de estrutura secundária no RNA. Sequências de bases específicas pequenas (assim como UUCG) são muitas vezes encontradas no final de grampos de RNA e são conhecidas por formarem alças particularmente firmes e estáveis. Tais sequências podem agir como pontos de partida para o enovelamento de uma molécula de RNA na sua estrutura tridimensional exata. Outras contribuições são feitas pelas ligações de hidrogênio que não fazem parte do pareamento de bases padrão do tipo Watson-Crick. Por exemplo, o grupo 2′-hidroxila da ribose pode formar ligações de hidrogênio com outros grupos. Algumas dessas propriedades são evidentes na estrutura do RNA transportador de fenilalanina de levedura – o tRNA responsável pela inserção de resíduos de Phe nos polipeptídeos – e em duas enzimas de RNA, ou ribozimas, cujas funções, assim como das enzimas proteicas, dependem das suas estruturas tridimensionais (**Figura 8-25**).

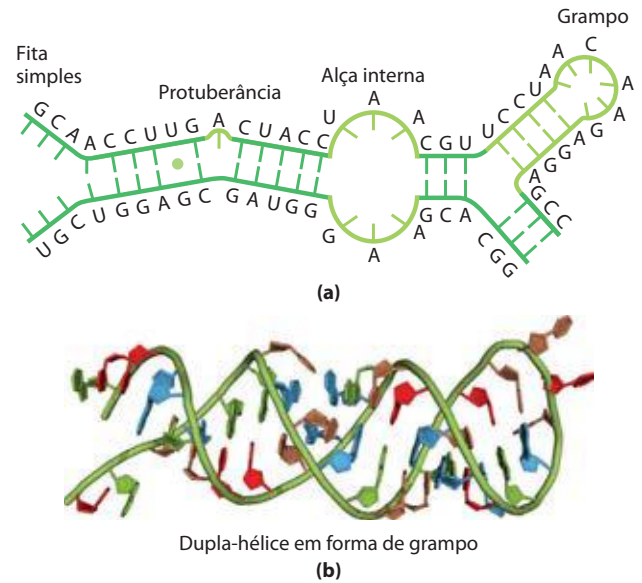



**FIGURA 8-23** **Estrutura secundária de RNA.** **(a)** Protuberância, alça interna e grampo. **(b)** As regiões pareadas geralmente têm uma hélice direita na forma A, como mostrado no grampo (derivado do PDB ID 1GID).

**FIGURA 8-24** **Estruturas helicoidais de pareamento de bases no RNA.** A possível estrutura secundária do componente RNA M1 da enzima RNase P de *E. coli*, com muitos grampos, está mostrada aqui. A RNase P, a qual também contém um componente proteico (não mostrado), funciona no processamento dos RNAs transportadores (ver Figura 26-26). Os dois colchetes indicam sequências complementares adicionais que podem estar pareadas na estrutura tridimensional. Os pontos azuis indicam pares de bases G═U do tipo não Watson-Crick (inserção no quadro). Observe que pares de bases G═U são permitidos somente quando cadeias pré-sintetizadas de RNA se dobram ou se anelam umas com as outras. Não há RNA-polimerases (as enzimas que sintetizam RNA a partir de um molde de DNA) para inserir uma U tendo como molde uma G, ou vice-versa, durante a síntese de RNA.

Uracila
Guanina

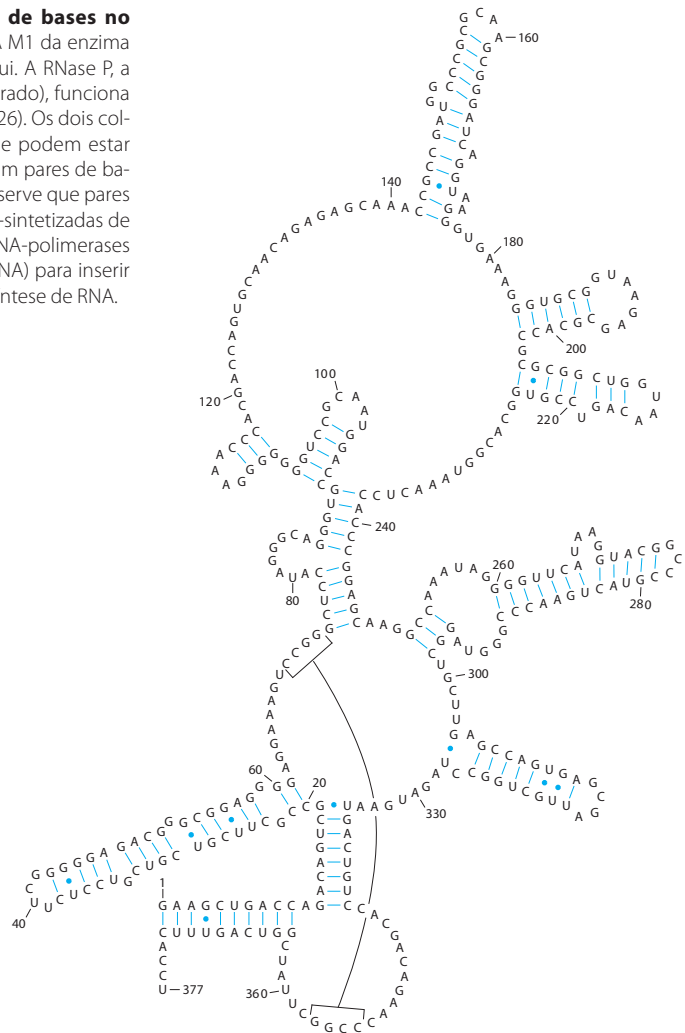
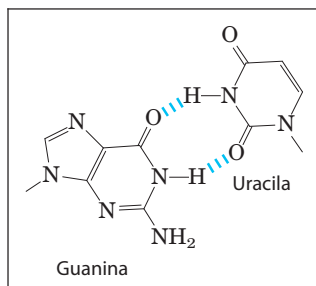
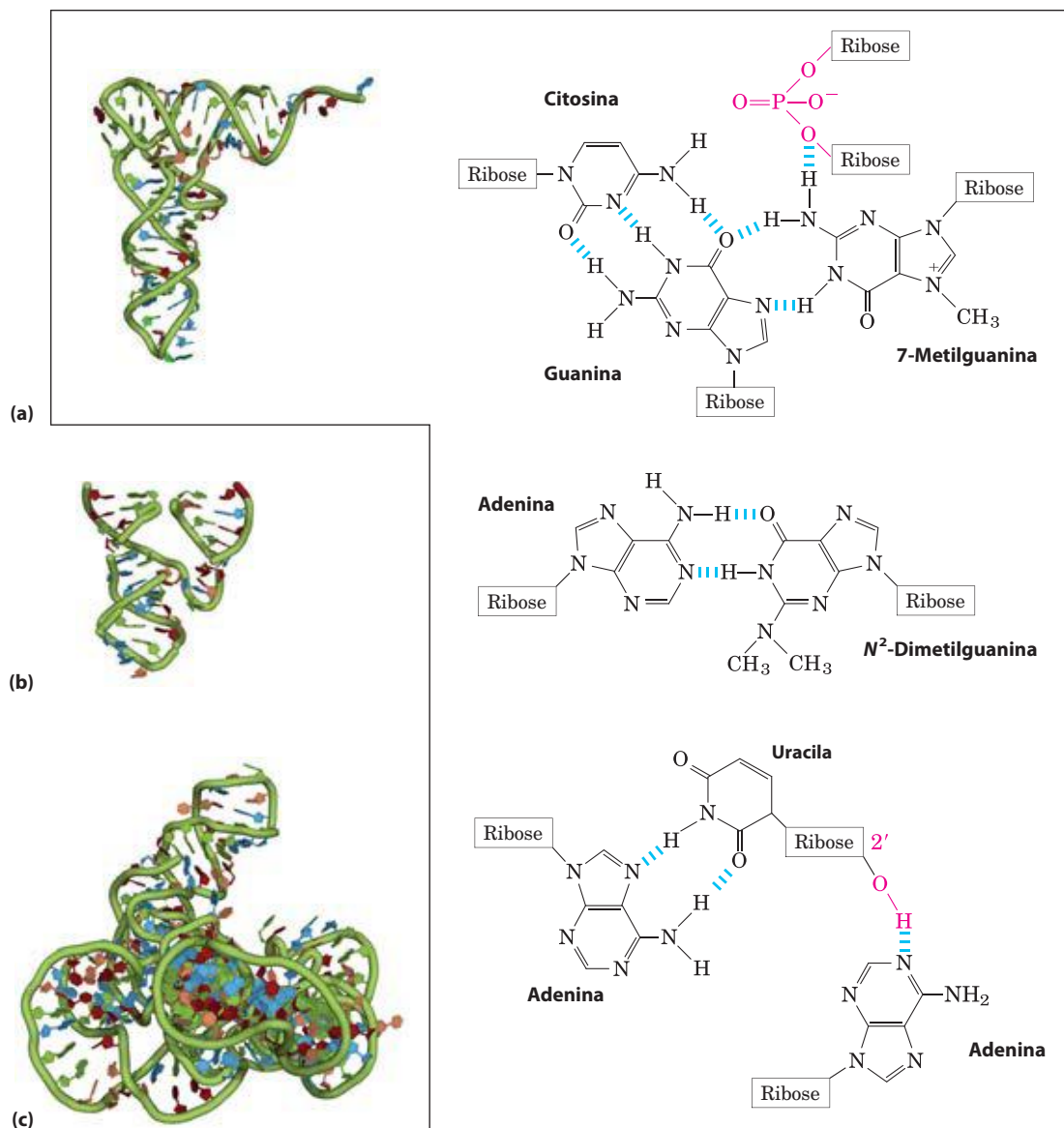



**FIGURA 8-25 Estrutura tridimensional do RNA. (a)** Estrutura tridimensional do tRNA de fenilalanina em levedura (PDB ID 1TRA). Alguns padrões de pareamento de bases incomuns encontrados neste tRNA estão mostrados. Observe também o envolvimento do oxigênio de uma ligação fosfodiéster da ribose em um arranjo de ligação de hidrogênio e um grupo 2′-hidroxila da ribose em outro (ambos em vermelho). **(b)** Ribozima cabeça-de-martelo (denominada desta forma devido à estrutura secundária no sítio ativo que parece a cabeça de um martelo), obtida de certos vírus de plantas (obtida de PDB ID 1MME). Ribozimas, ou enzimas de RNA, catalisam uma variedade de reações, principalmente do metabolismo de RNA e na síntese proteica. As estruturas tridimensionais complexas desses RNAs refletem a complexidade inerente na catálise, como descrito para enzimas proteicas no Capítulo 6. **(c)** Segmento de mRNA conhecido como íntron, de um protozoário ciliado *Tetrahymena thermophila* (obtido do PDB ID 1GRZ). Esse íntron (uma ribozima) catalisa sua própria excisão do meio dos éxons em uma cadeia de mRNA (discutido no Capítulo 26).

A análise da estrutura do RNA e a relação entre estrutura e função compõem um campo emergente de pesquisa com muitas das mesmas complexidades da análise de estrutura proteica. A importância da compreensão da estrutura do RNA cresce à medida que surgem mais informações sobre o grande número de papéis funcionais das moléculas de RNA.

## RESUMO 8.2 Estrutura dos ácidos nucleicos

- Muitas linhas de evidência demonstram que o DNA carrega a informação genética. Alguns dos primeiros indícios vieram do experimento de Avery-MacLeod-McCarty, o qual demonstrou que o DNA isolado de uma linhagem bacteriana pode entrar em células de outra linhagem e transformá-las, dotando-as com algumas características hereditárias do doador. O experimento de Hershey-Chase demonstrou que o DNA de um vírus bacteriano, mas não a sua cobertura proteica, carrega a mensagem genética para a replicação do vírus na célula hospedeira.
- Reunindo todas as informações, Watson e Crick postularam que o DNA nativo é constituído por duas cadeias

antiparalelas em uma organização de dupla-hélice com orientação à direita. Pares de bases complementares, A═T e G≡C, são formados por ligações de hidrogênio dentro da hélice. Os pares de bases são empilhados perpendicularmente ao longo do eixo da dupla-hélice, a uma distância de 3,4 Å, com 10,5 pares de bases por volta.

- O DNA pode existir em várias formas estruturais. Duas variações da forma de Watson-Crick, ou B-DNA, são A-DNA e Z-DNA. Algumas variações estruturais dependentes de sequência causam enovelamentos na molécula de DNA. As cadeias de DNA com sequências específicas podem formar grampos ou estruturas cruciformes ou triplex de DNA ou tetraplex de DNA.
- O RNA mensageiro transfere a informação genética do DNA para os ribossomos para a síntese proteica. O RNA transportador e o RNA ribossômico também estão envolvidos na síntese proteica. O RNA pode ser complexo estruturalmente; cadeias simples de RNA podem se dobrar em grampos, regiões de cadeia dupla ou alças complexas.

## 8.3 Química dos ácidos nucleicos

O papel do DNA como repositório da informação genética depende em parte da sua estabilidade inerente. As transformações químicas que ocorrem geralmente são muito lentas na ausência de um catalisador enzimático. Entretanto, o armazenamento de longo prazo da informação inalterada é tão importante para a célula que mesmo reações muito lentas que alteram a estrutura do DNA podem ser fisiologicamente significativas. Processos como carcinogênese e envelhecimento podem estar intimamente ligados ao acúmulo lento e irreversível de alterações no DNA. Outras alterações, não destrutivas, também ocorrem e são essenciais para a função, como a separação das cadeias que deve preceder a replicação do DNA ou a transcrição. Além de proporcionar maior compreensão dos processos fisiológicos, nosso conhecimento da química dos ácidos nucleicos nos concedeu um conjunto poderoso de tecnologias que tem aplicações em biologia molecular, na medicina e na ciência forense. Agora serão examinadas as propriedades químicas do DNA e algumas dessas tecnologias.

### DNA e RNA duplas-hélices podem ser desnaturados

Soluções de DNA nativo isolado cuidadosamente podem ser muito viscosas em pH 7,0 e em temperatura ambiente (25°C). Quando essa solução é submetida a valores de pH extremos ou a temperaturas acima de 80°C, sua viscosidade diminui drasticamente, indicando que o DNA sofreu uma mudança física. Da mesma forma que calor e valores de pH extremos desnaturam proteínas globulares, eles também causam desnaturação, ou fusão, da dupla-hélice do DNA. Rompimento das ligações de hidrogênio entre pares de bases e de bases empilhadas causam desenrolamento da dupla-hélice para formar duas cadeias simples, completamente separadas uma da outra pela molécula inteira ou de parte da molécula (desnaturação parcial). Nenhuma ligação covalente no DNA é rompida (**Figura 8-26**).

A renaturação da molécula do DNA é um processo rápido de uma etapa, contanto que um segmento helicoidal duplo de pouco mais de uma dúzia de resíduos ainda mantenha as duas cadeias unidas. Quando a temperatura ou o pH retornam para a faixa em que a maioria dos organismos vivem, os segmentos desenrolados das duas cadeias espontaneamente se enrolam, ou **pareiam**, para produzir o duplex intacto (Figura 8-26). Entretanto, se as duas cadeias são separadas completamente, a renaturação ocorre em duas etapas. Na primeira, relativamente lenta, as duas cadeias "acham" uma à outra por colisões aleatórias e formam um segmento pequeno de dupla-hélice complementar. A segunda etapa é muito mais rápida: as bases não pareadas remanescentes vêm sucessivamente se apresentando como pares de bases, e as duas cadeias se unem, como se fosse o fechamento de um zíper, para formar a dupla-hélice.

A estreita interação entre bases empilhadas nos ácidos nucleicos tem o efeito de diminuir sua absorção em luz UV em comparação com a da solução com a mesma concentração de nucleotídeos livres, e a absorção diminui ainda mais quando duas cadeias complementares de ácidos nucleicos estão pareadas. Isso é chamado de efeito hipocrômico. A desnaturação de um ácido nucleico de cadeia dupla produz o resultado oposto: aumento na absorção de-

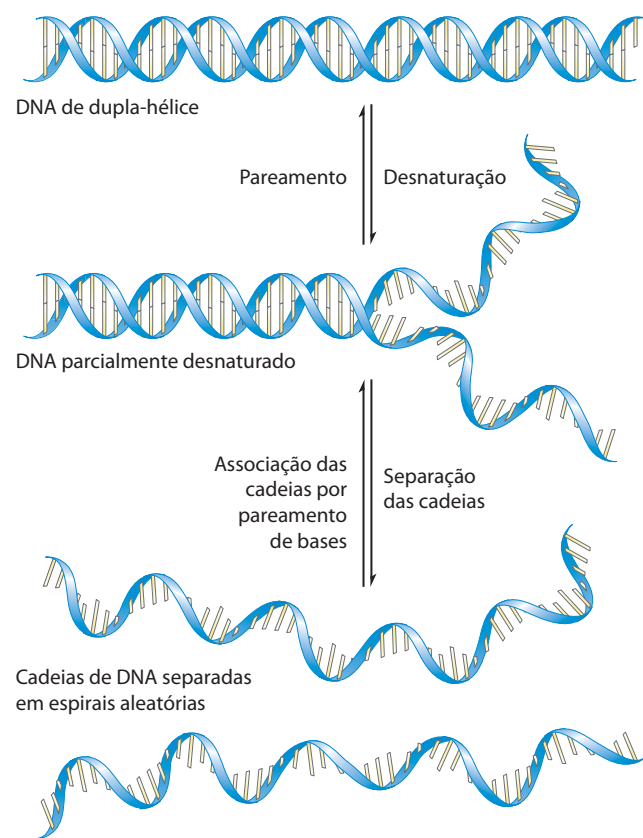



**FIGURA 8-26 Desnaturação reversível e anelamento (renaturação) do DNA.**

nominado efeito hipercrômico. A transição entre DNA de cadeia dupla e a forma desnaturada de cadeia única pode ser então detectada pelo monitoramento da absorção de luz UV a 260 nm.

Moléculas de DNA bacteriano ou viral em solução desnaturam quando são aquecidas vagarosamente (**Figura 8-27**). Cada espécie de DNA apresenta uma temperatura de desnaturação característica, ou ponto de fusão ($t_m$; formalmente, a temperatura na qual a metade do DNA está presente na forma de cadeias únicas separadas): quanto maior o seu conteúdo de pares de bases G≡C, mais alto o ponto de fusão deste DNA. Isso é devido ao fato de o pareamento de bases G≡C, com três ligações de hidrogênio, necessitar de mais calor para se dissociar do que o pareamento de bases A═T. Portanto, o ponto de fusão da molécula de DNA, determinada sob condições fixas de pH e força iônica, pode produzir uma estimativa da sua composição de bases. Se as condições desnaturantes forem controladas cuidadosamente, regiões que são ricas em pareamentos de bases A═T serão especificamente desnaturadas, enquanto a maior parte do DNA permanece como cadeia dupla. Essas regiões desnaturadas (denominadas bolhas) podem ser visualizadas em microscopia eletrônica (**Figura 8-28**). Observe que, na separação das cadeias do DNA que ocorre *in vivo* durante processos como replicação de DNA e transcrição, os sítios onde esses processos iniciam são muitas vezes ricos em pares de bases A═T, como será visto a seguir.

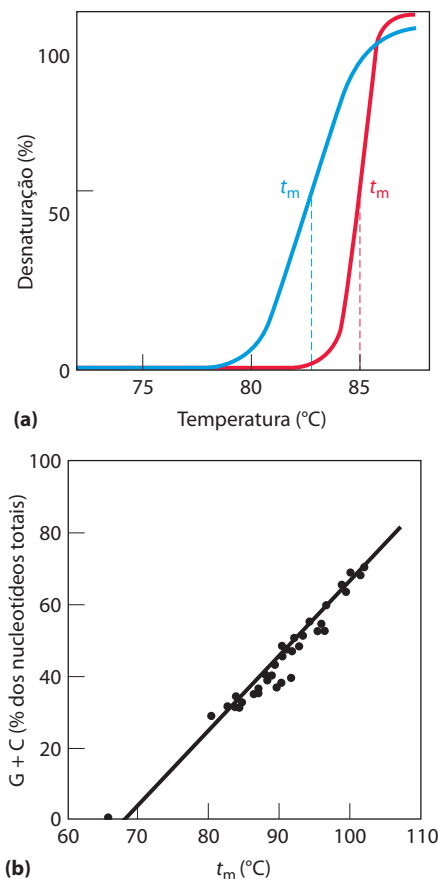



**FIGURA 8-27 Desnaturação do DNA pelo calor. (a)** As curvas de desnaturação, ou fusão, de duas amostras de DNA. A temperatura no ponto médio da transição ($t_m$) é o ponto de fusão, que depende do pH, da força iônica e do tamanho e da composição de bases do DNA. **(b)** Relação entre $t_m$ e o conteúdo G + C do DNA.

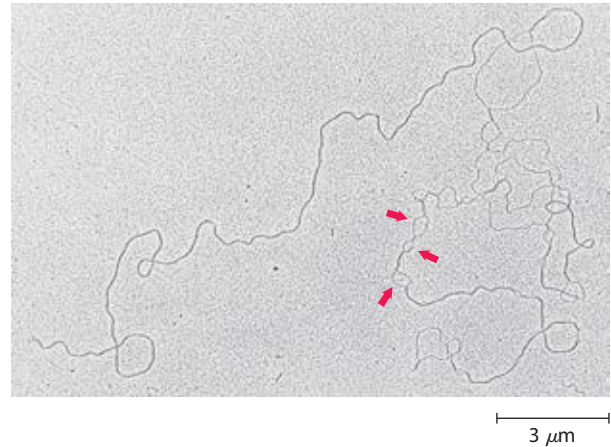



**FIGURA 8-28 DNA parcialmente desnaturado.** Este DNA foi parcialmente desnaturado, sendo então fixado para evitar renaturação durante o preparo da amostra. O método do sombreamento utilizado para visualizar o DNA nesta micrografia eletrônica aumenta seu diâmetro em aproximadamente cinco vezes e suprime a maioria dos detalhes da hélice. Entretanto, medidas de comprimento podem ser obtidas, e regiões de fita simples são facilmente distinguíveis de regiões de fita dupla. As setas apontam para algumas bolhas de fita simples onde a desnaturação ocorreu. As regiões que desnaturam são altamente reproduzíveis e são ricas em pareamentos de bases A═T.

Os duplex de duas cadeias de RNA ou uma cadeia de RNA e uma cadeia de DNA (híbrido RNA-DNA) também podem ser desnaturados. Especialmente, os duplex de RNA são mais estáveis que duplex de DNA. Em pH neutro, a desnaturação de RNA de cadeia dupla muitas vezes necessita de temperaturas de 20ºC ou mais altas do que as temperaturas necessárias para a desnaturação de uma molécula de DNA com sequência semelhante. A estabilidade de um híbrido RNA-DNA geralmente é intermediária entre a do RNA e a do DNA. As bases físicas para essas diferenças em estabilidade térmica são desconhecidas.

## Ácidos nucleicos de espécies diferentes podem formar híbridos

A capacidade de duas cadeias de DNA parearem uma com a outra pode ser usada para identificar sequências de DNA semelhantes em duas espécies distintas ou no genoma de uma mesma espécie. Se os duplex de DNA isolados de células humanas e de células murinas são completamente desnaturados por aquecimento, sendo então misturados e mantidos em temperaturas em torno de 25ºC abaixo do seu $t_m$ por muitas horas, grande quantidade do DNA irá se parear. A taxa de pareamento do DNA é afetada pela temperatura, pelo comprimento e pela concentração dos fragmentos de DNA a serem pareados, pela concentração de sais na mistura de reação e pelas propriedades da sua própria sequência

(isto é, complexidade e conteúdo G≡C). A temperatura é especialmente importante. Se for muito baixa, sequências curtas de moléculas de DNA com semelhanças coincidentes em partes distantes e heterólogas irão se parear improdutivamente e interferir com o alinhamento geral de cadeias complementares de DNA. Temperaturas muito altas irão favorecer a desnaturação. A maioria do reanelamento ocorre entre cadeias complementares de DNA murino para formar duplex de DNA murino; do mesmo modo, a maioria das cadeias de DNA humano pareia com cadeias complementares de DNA humano. Entretanto, algumas cadeias de DNA murino irão se associar com cadeias de DNA humano para dar origem a **duplex híbridos**, nos quais segmentos de cadeia de DNA murino formam regiões de pareamento de bases com segmentos de cadeia de DNA humano (**Figura 8-29**). Isso reflete uma herança evolutiva comum; organismos diferentes em geral têm muitas proteínas e RNAs com funções semelhantes e, frequentemente, estruturas semelhantes. Em muitos casos, os DNAs que codificam essas proteínas e RNAs têm sequências semelhantes. Quanto mais próxima a relação evolutiva entre duas espécies, mais facilmente seus DNAs irão hibridizar. Por exemplo, DNA humano hibridiza muito mais facilmente com DNA murino do que com DNA de levedura.

A hibridização de cadeias de DNA de fontes distintas constitui o princípio básico para um poderoso conjunto de metodologias essenciais para a prática moderna de genética molecular. Uma sequência de DNA específica ou um gene pode ser identificado na presença de muitas outras sequências, se já existir uma cadeia de DNA complementar (geralmente marcada de alguma forma) adequada para hibridizar com ela (Capítulo 9). O DNA complementar pode ser de uma espécie diferente ou da mesma espécie, ou pode ser sintetizado quimicamente no laboratório usando técnicas descritas a seguir neste capítulo. Técnicas de hibridização podem ser adaptadas para detectar um RNA em vez de um DNA. O isolamento e a identificação de genes específicos e RNA se baseiam nessas técnicas de hibridização. Aplicações dessa tecnologia tornam possível a identificação de um indivíduo com base em um único fio de cabelo deixado na cena de um crime ou a predição do início de uma doença décadas antes do aparecimento dos sintomas (ver Quadro 9-1).

**FIGURA 8-29 Hibridização do DNA.** Duas amostras de DNA, para serem comparadas, são completamente desnaturadas pelo calor. Quando as duas soluções são misturadas e resfriadas lentamente, as cadeias de DNA de cada amostra irão se associar com seus parceiros complementares normais e se anelar para formar duplex. Se dois DNA têm semelhança de sequência significativa, eles também tendem a formar duplex parciais ou híbridos um com o outro: quanto maior a semelhança de sequência entre dois DNAs, maior o número de híbridos formados. A formação de híbridos pode ser medida de várias maneiras. Um dos DNAs geralmente é marcado com um isótopo radioativo para simplificar sua detecção e as medidas.

## Nucleotídeos e ácidos nucleicos sofrem transformações não enzimáticas

Purinas e pirimidinas, juntamente com os nucleotídeos dos quais elas são parte, sofrem alterações espontâneas na sua estrutura covalente. O índice dessas reações em geral é *muito lento*, mas essas reações são fisiologicamente significativas devido à tolerância muito baixa da célula para alterações em sua informação genética. Alterações na estrutura do DNA que produzem mudanças permanentes na informação genética codificadas pelo DNA são chamadas de **mutações**, e muitas evidências sugerem uma ligação estreita entre o acúmulo de mutações em um organismo individual e os processos de envelhecimento e carcinogênese.

Várias bases nucleotídicas sofrem perda espontânea de seus grupamentos amino exocíclicos (desaminação) (**Figura 8-30a**). Por exemplo, em condições celulares típicas, a desaminação da citosina (no DNA) a uracila ocorre em aproximadamente um em cada $10^7$ resíduos de citidina em 24 horas. Isso corresponde a cerca de 100 eventos espontâneos por dia, em média, em uma célula de mamífero. A desaminação de adenina e guanina ocorre em taxas de cerca de 1/100.

A reação lenta de desaminação da citosina parece inócua o suficiente, mas é quase seguramente a razão pela qual o DNA contém timina em vez de uracila. O produto da desaminação da citosina (uracila) é rapidamente reconhecido como estranho no DNA, sendo removido pelo sistema de reparo (Capítulo 25). Se o DNA normalmente tivesse uracila, o reconhecimento de uracilas resultantes da desaminação da citosina seria mais difícil, e uracilas não reparadas conduziriam a mudanças permanentes na sequência, fazendo o pareamento com adeninas durante a replicação. A desaminação de citosina gradualmente conduziria a uma diminuição nos pares de bases G≡C e a um aumento nos pares de bases A═U no DNA de todas as células. Através dos milênios, a desaminação de citosina poderia eliminar pares de bases G≡C e o código genético que depende desses pares de bases. O estabelecimento da timina como uma das quatro bases no DNA pode ter sido um dos pontos cruciais de reviravolta na evolução, tornando possível o armazenamento de longo prazo da informação genética.

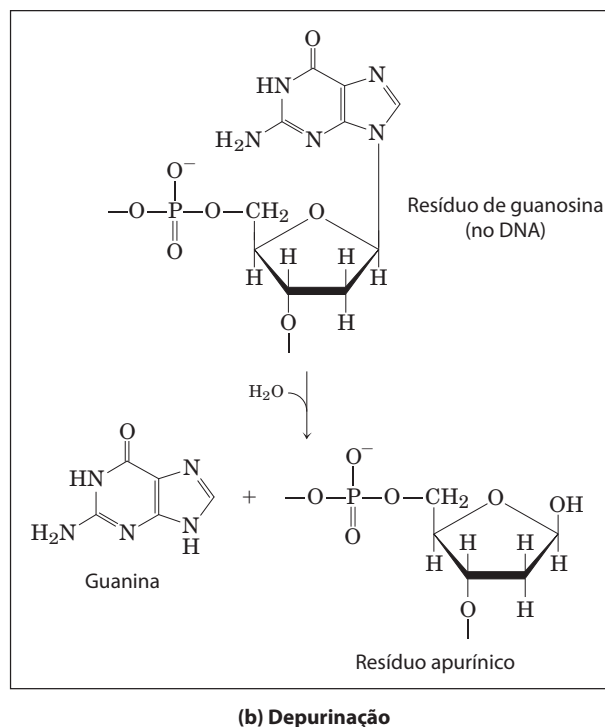
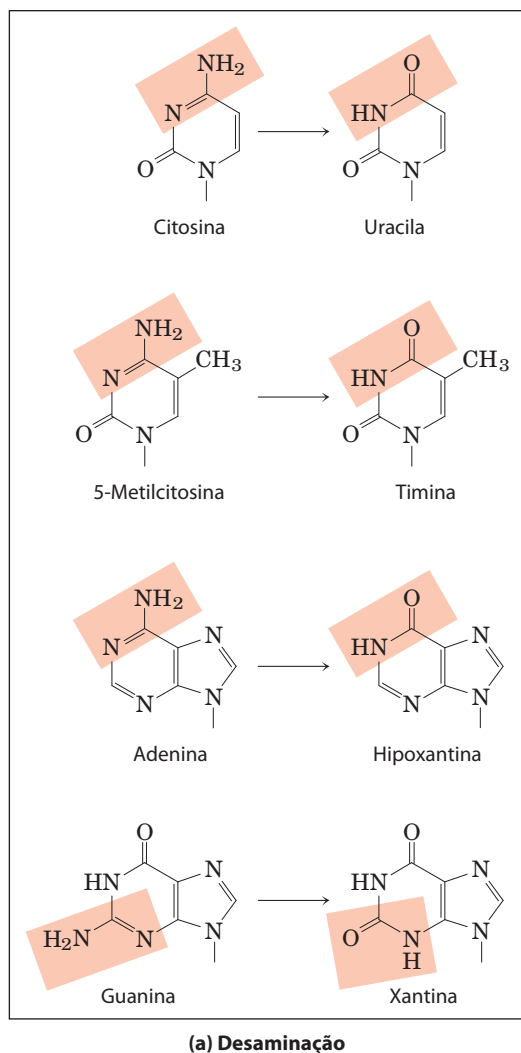
**(a) Desaminação**

**(b) Depurinação**

**FIGURA 8-30 Algumas reações não enzimáticas bem caracterizadas dos nucleotídeos. (a)** Reações de desaminação. Apenas a base está mostrada. **(b)** Depurinação, em que uma purina é perdida pela hidrólise da ligação *N*-*β*-glicosídica. A perda de pirimidinas ocorre por meio de uma reação semelhante, mas muito mais lentamente. A lesão resultante, com a desoxirribose presente e a base ausente, é chamada de sítio abásico ou sítio AP (sítio apurínico ou, raramente, apirimidínico). A desoxirribose remanescente após a depurinação é rapidamente convertida de *β*-furanose para a forma aldeídica (ver Figura 8-3), desestabilizando ainda mais o DNA nessa posição. Reações não enzimáticas adicionais estão ilustradas nas Figuras 8-31 e 8-32.

Outra reação importante nos desoxirribonucleotídeos é a hidrólise da ligação *N*-*β*-glicosídica entre a base e a pentose, para criar uma lesão no DNA chamada de sítio AP (apurínico, apirimidínico) ou sítio abásico (Figura 8-30b). Isso ocorre a uma taxa maior para purinas do que para pirimidinas. Cerca de uma em cada $10^5$ purinas (10.000 por célula de mamíferos) é perdida do DNA a cada 24 horas em condições celulares típicas. A depurinação de ribonucleotídeos e do RNA é muito mais lenta e, em geral, não é considerada fisiologicamente significativa. No tubo de ensaio, a perda de purinas pode ser acelerada por ácido diluído. Incubação de DNA em pH 3 causa remoção seletiva de bases púricas, resultando no derivado denominado ácido apurínico.

Outras reações são promovidas pela radiação. A luz UV induz a condensação de dois grupos etilenos para formar um anel ciclobutano. Na célula, a mesma reação entre bases pirimídicas adjacentes nos ácidos nucleicos forma dímeros pirimídicos ciclobutanos. Isso ocorre mais frequentemente entre resíduos de timina adjacentes na mesma hélice de DNA (**Figura 8-31**). Um segundo tipo de dímero de pirimidinas, chamado de fotoproduto 6-4, também é formado durante irradiação UV. Radiações ionizantes (raios X e raios gama) podem causar abertura de anel e fragmentação de bases, assim como quebras dos esqueletos covalentes dos ácidos nucleicos.

Praticamente todas as formas de vida são expostas a radiação de alta energia capaz de causar mudanças químicas no DNA. Sabe-se que a radiação UV curta (com comprimento de ondas de 200 a 400 nm), que compõe uma porção significativa do espectro solar, causa a formação de dímeros de pirimidina e outras mudanças químicas no DNA de bactérias e de células da pele humana. Humanos estão sujeitos constantemente a um campo de radiações ionizantes na forma de raios cósmicos, os quais podem penetrar profundamente na terra, assim como às radiações emitidas por elementos radioativos, como rádio, plutônio, urânio, radônio, $^{14}C$ e $^{3}H$. Raios X usados em exames médicos e dentais e na radioterapia de câncer e outras doenças são outra forma de radiação ionizante. É estimado que radiações ionizantes e UV sejam responsáveis por cerca de 10% de todo dano no DNA causado por agentes ambientais.

O DNA também pode ser danificado por reagentes químicos introduzidos no ambiente como produtos de atividade industrial. Tais produtos podem não ser prejudiciais por si só, mas podem ser metabolizados pelas células em formas que o são. Existem duas classes principais desses compos-

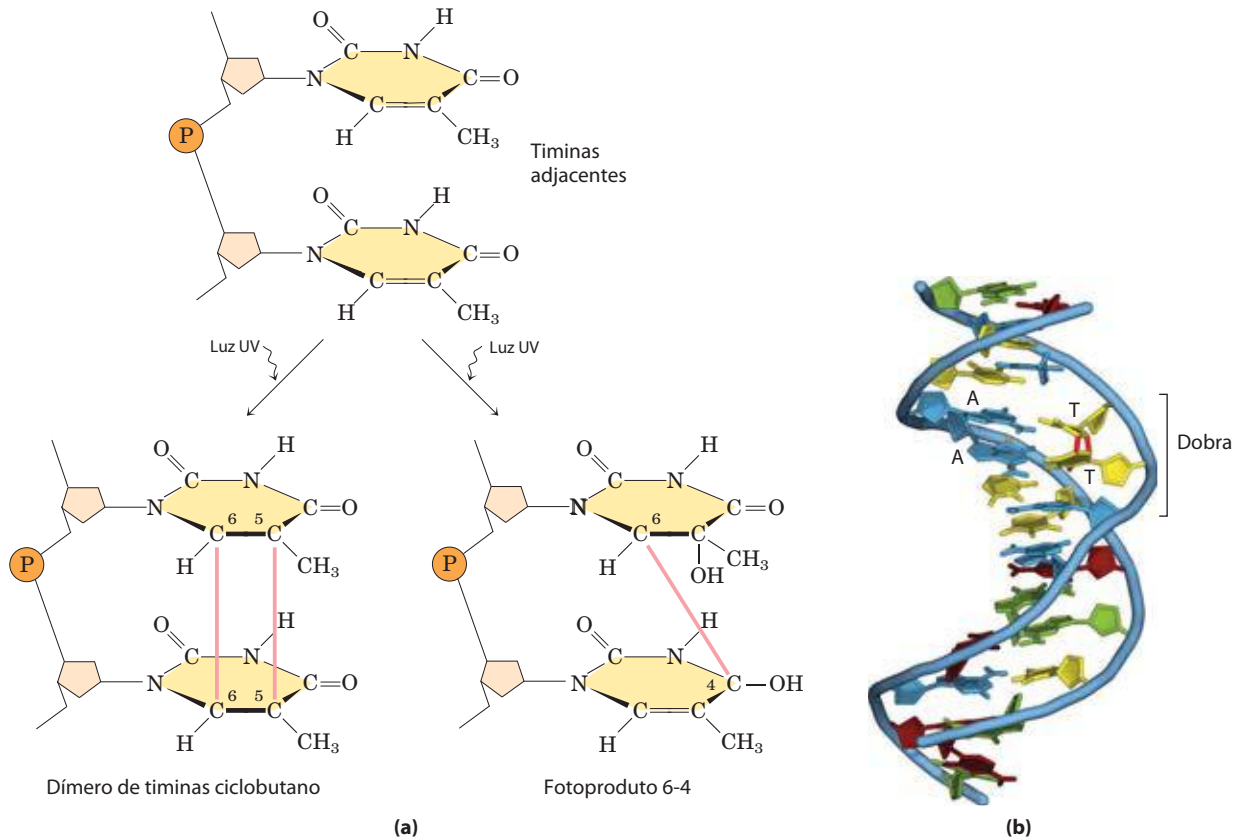



**FIGURA 8-31 Formação de dímeros de pirimidinas induzidos por luz UV.** **(a)** Um tipo de reação (à esquerda) resulta na formação de um anel ciclobutil envolvendo C-5 e C-6 de resíduos de pirimidinas adjacentes. Uma reação alternativa (à direita) resulta no fotoproduto 6-4, com uma ligação entre C-6 de uma pirimidina e C-4 da pirimidina vizinha. **(b)** A formação de um dímero de pirimidinas ciclobutano introduz um ângulo ou dobra no DNA (PDB ID 1TTD).

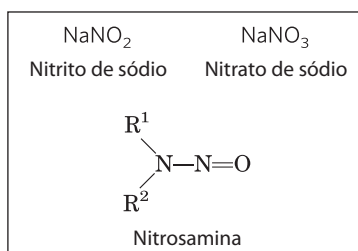
tos (**Figura 8-32**): (1) agentes desaminantes, especialmente ácido nitroso ($HNO_2$) ou compostos que podem ser metabolizados a ácido nitroso ou nitritos e (2) agentes alquilantes.

O ácido nitroso, formado a partir de precursores orgânicos, como nitrosaminas, e a partir de sais de nitrito e de nitratos, é um potente acelerador de desaminação de bases. O bissulfito tem efeitos semelhantes. Ambos os agentes são usados como conservantes em alimentos processados para evitar o crescimento de bactérias tóxicas. Eles não parecem aumentar significativamente os riscos de câncer quando usados dessa forma, talvez pelo fato de serem usados em pequenas quantidades e representarem apenas uma pequena contribuição para os níveis de dano no DNA. (O risco potencial para a saúde de alimentos estragados seria muito maior se esses conservantes não fossem usados.)

**FIGURA 8-32 Agentes químicos que causam dano ao DNA.** **(a)** Precursores de ácido nitroso, que promovem reações de desaminação. **(b)** Agentes alquilantes. Apenas a *S*-adenosilmetionina age enzimaticamente.

$NaNO_2$ Nitrito de sódio

$NaNO_3$ Nitrato de sódio

Nitrosamina

**(a) Precursores do ácido nitroso**

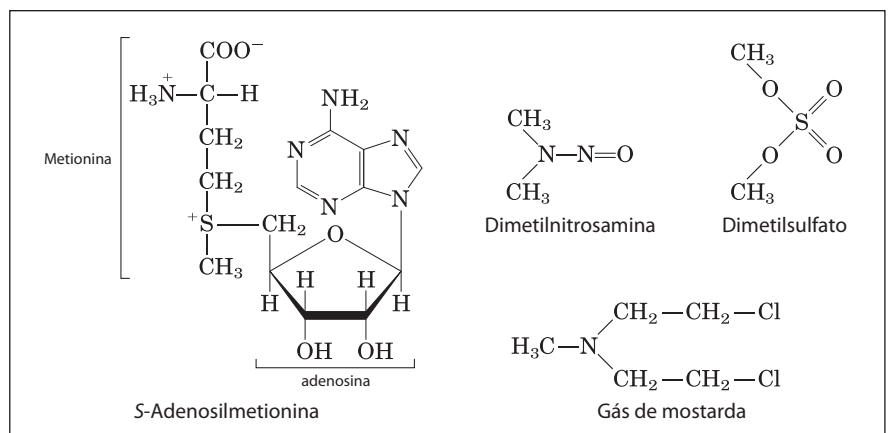
Metionina

adenosina

*S*-Adenosilmetionina

Dimetilnitrosamina

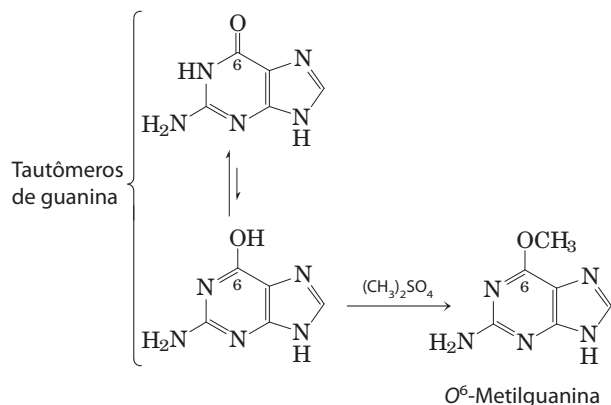
Dimetilsulfato

Gás de mostarda

**(b) Agentes alquilantes**

Agentes alquilantes podem alterar certas bases do DNA. Por exemplo, o reagente químico dimetilsulfato (Figura 8-32b) pode metilar a guanina para produzir $O^6$-metilguanina, a qual não pode parear com a citosina.

Tautômeros de guanina

$(CH_3)_2SO_4$

$O^6$-Metilguanina

Muitas reações semelhantes são realizadas por agentes alquilantes normalmente presentes nas células, como *S*-adenosilmetionina.

A fonte mais importante de alterações mutagênicas no DNA é o dano oxidativo. Espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e radicais superóxidos, surgem durante irradiação ou como um subproduto do metabolismo aeróbio. Dessas espécies, os radicais hidroxila são responsáveis pela maioria dos danos oxidativos no DNA. As células têm um sistema de defesa elaborado para destruir espécies reativas de oxigênio, incluindo enzimas como a catalase e a superóxido-desmutase, que convertem espécies reativas de oxigênio a produtos inofensivos. Entretanto, uma fração desses oxidantes inevitavelmente escapa das defesas celulares e o dano ao DNA ocorre por meio de um grande e complexo grupo de reações, que variam de oxidação da desoxirribose e das bases a quebras na hélice. Estimativas precisas da extensão desse dano não estão disponíveis, mas cada dia o DNA de cada célula humana está sujeito a milhares de reações oxidativas que causam dano.

Isso é apenas uma amostra das reações mais conhecidas que causam dano ao DNA. Muitos compostos carcinogênicos nos alimentos, na água e no ar exercem seus efeitos cancerígenos por modificações das bases do DNA. Apesar disso, a integridade do DNA como polímero é mais bem mantida do que a do RNA e da proteína, pois o DNA é a única macromolécula que se beneficia de sistemas de reparo bioquímicos. Esses processos de reparo (descritos no Capítulo 25) diminuem muito o impacto do dano ao DNA. ■

## Algumas bases do DNA são metiladas

Certas bases nucleotídicas em moléculas de DNA são metiladas enzimaticamente. A adenina e a citosina são metiladas com mais frequência do que guanina e timina. A metilação geralmente é restrita a certas sequências ou regiões da molécula de DNA. Em alguns casos, a função da metilação é bem conhecida; em outros, a função permanece obscura. Todas as metilases de DNA conhecidas usam *S*-adenosilmetionina como doador de um grupo metila (Figura 8-32b). A *E. coli* tem dois sistemas notáveis de metilação. Um serve como parte de um mecanismo de defesa que ajuda a célula a distinguir seu DNA do DNA exógeno por marcar seu próprio DNA com grupos metila e destruir o DNA (exógeno) sem os grupos metila (isso é conhecido como um sistema de modificação-restrição; ver p. 314). O outro sistema metila resíduos de adenosina dentro da sequência (5′)GATC(3′) a $N^6$-metiladenosina (Figura 8-5a). Isso é mediado pela Dam (*DNA adenine methylation*) metilase, um componente de um sistema que repara pares de bases mal pareados formados ocasionalmente durante a replicação do DNA (ver Figura 25-21).

Em células eucarióticas, em torno de 5% dos resíduos de citidina no DNA são metilados a 5-metilcitidina (Figura 8-5a). A metilação é mais comum em sequências CpG, produzindo metil-CpG simetricamente em ambas as hélices do DNA. A extensão da metilação em sequências CpG varia de acordo com a região molecular em grandes moléculas de DNA eucariótico.

## As sequências de longas hélices de DNA podem ser determinadas

Por sua capacidade de ser um repositório de informação, a propriedade mais importante de uma molécula de DNA é a sua sequência de nucleotídeos. Até o final dos anos de 1970, a determinação da sequência de um ácido nucleico contendo até mesmo 5 ou 10 nucleotídeos era muito trabalhosa. O desenvolvimento de duas novas técnicas em 1977, uma por Alan Maxam e Walter Gilbert e a outra por Frederick Sanger, tornou possível o sequenciamento de moléculas grandes de DNA com uma tranquilidade não imaginada poucos anos antes. As técnicas contavam com um melhor conhecimento da química dos nucleotídeos e do metabolismo do DNA e em métodos eletroforéticos para separação das cadeias de DNA diferindo em tamanho por apenas um nucleotídeo. A eletroforese de DNA é semelhante a das proteínas (ver Figura 3-18). Poliacrilamida muitas vezes é usada como a matriz do gel para pequenas moléculas de DNA (até poucas centenas de nucleotídeos); agarose geralmente é usada para fragmentos maiores de DNA.

Em ambos os sequenciamentos de Maxam-Gilbert e de Sanger, o princípio geral é reduzir o DNA a quatro grupos de fragmentos marcados. A reação que produz cada um desses grupos é base-específica, de forma que os comprimentos dos fragmentos correspondem a posições de uma determinada base na sequência de DNA. Por exemplo, para um oligonucleotídeo com a sequência pAATCGACT, marcado na extremidade 5′ (a extremidade à esquerda), uma reação que quebra o DNA após cada resíduo de C irá gerar dois fragmentos marcados: um fragmento de quatro nucleotídeos e um fragmento de sete nucleotídeos; uma reação que quebra o DNA após cada resíduo de G irá produzir apenas um fragmento marcado de cinco nucleotídeos. Devido aos fragmentos serem marcados radioativamente nas suas extremidades 5′, apenas o fragmento no lado 5′ da quebra é visualizado. Os tamanhos dos fragmentos correspondem às posições relativas dos resíduos de C e G na sequência. Quando os grupos de fragmentos que correspondem a cada uma das quatro bases são separados eletroforeticamente lado a lado, eles produzem uma escada de bandas na qual a sequência pode ser lida diretamente (**Figura 8-33**). Aqui

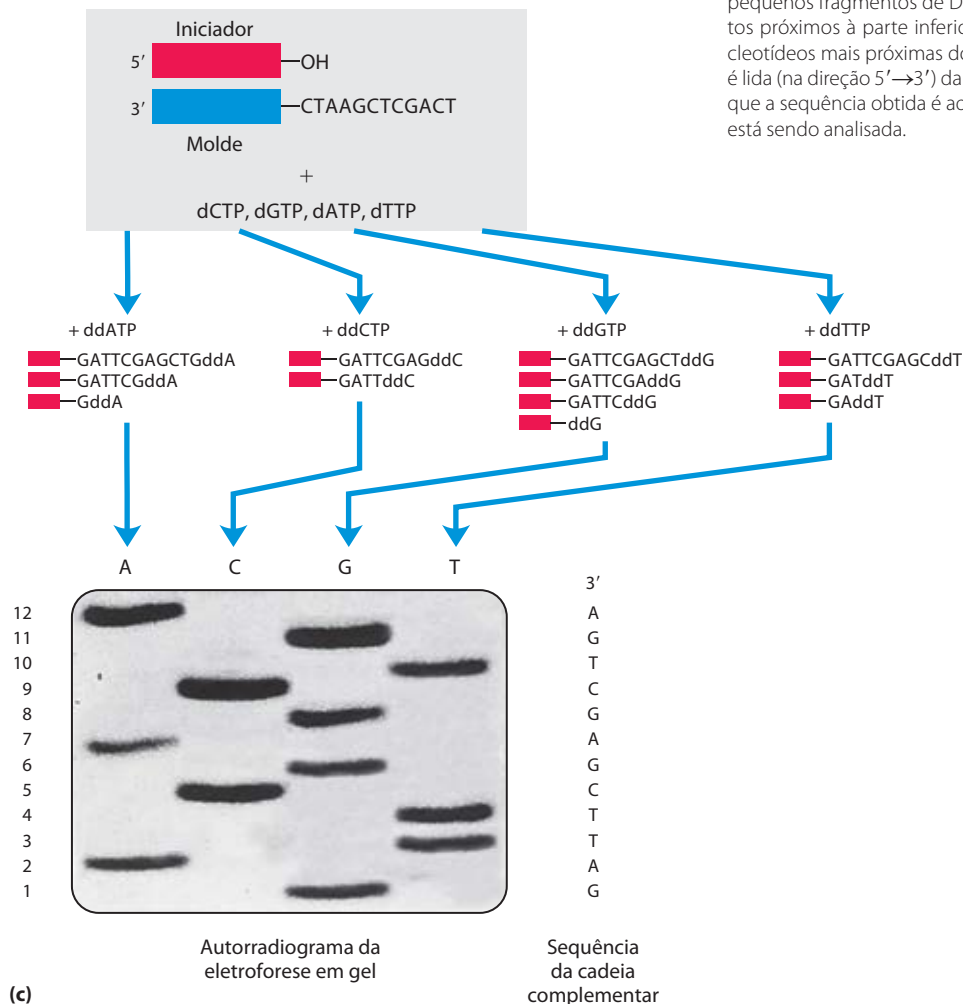
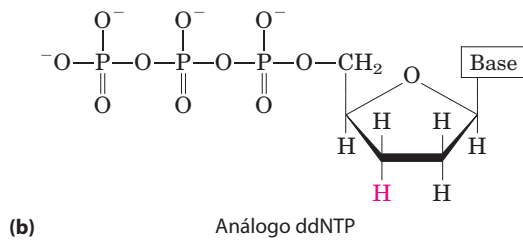
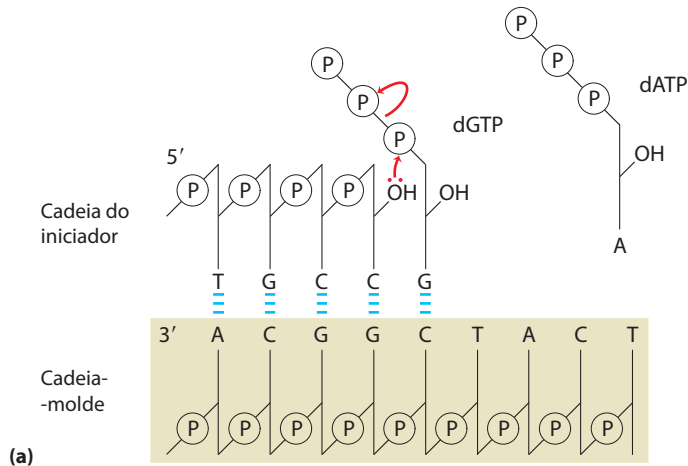



**FIGURA 8-33 Sequenciamento de DNA pelo método de Sanger.** Esse método utiliza o mecanismo de síntese de DNA pela DNA-polimerase (Capítulo 25). **(a)** As DNA-polimerases necessitam de um iniciador (uma cadeia oligonucleotídica curta), ao qual os nucleotídeos serão adicionados, e uma cadeia-molde para guiar a seleção de cada novo nucleotídeo. Nas células, o grupo 3′-hidroxila do iniciador reage com um desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP) que está entrando para formar uma nova ligação fosfodiéster. **(b)** O procedimento do sequenciamento de Sanger usa análogos de didesoxinucleosídeos trifosfatos (ddNTP) para interromper a síntese de DNA. (O método de Sanger também é conhecido como o método didesóxi.) Quando um ddNTP é introduzido no lugar de um dNTP, o alongamento da cadeia para após a adição do análogo, porque falta o grupo 3′-hidroxila necessário para o próximo passo. **(c)** O DNA a ser sequenciado é usado como a cadeia-molde, e um iniciador curto, marcado radioativamente ou com fluorescência, pareia com ele. Pela adição de pequenas quantidades de um único ddNTP, por exemplo, ddCTP, a um sistema normal de reação, as cadeias sintetizadas serão prematuramente terminadas em determinadas posições quando um dC ocorre normalmente. Dado o excesso de dCTP sobre o ddCTP, a chance do análogo ser incorporado sempre que dC deve ser adicionado é pequena. Entretanto, ddCTP está presente em quantidades suficientes para assegurar que cada nova cadeia tenha uma probabilidade alta de adquirir pelo menos um ddC em algum ponto durante a síntese. O resultado é uma solução contendo uma mistura de fragmentos marcados, cada um deles terminando com um resíduo de C. Cada resíduo de C na sequência produz um grupo de fragmentos de um tamanho específico, de forma que os fragmentos de tamanhos diferentes, separados por eletroforese, demonstram a localização do resíduo de C. Esse procedimento é repetido separadamente para cada um dos quatro ddNTP e a sequência pode ser lida diretamente do autorradiograma do gel. Como pequenos fragmentos de DNA migram mais rapidamente, os fragmentos próximos à parte inferior do gel representam as posições dos nucleotídeos mais próximas do iniciador (a extremidade 5′) e a sequência é lida (na direção 5′→3′) da parte inferior para a parte superior. Observe que a sequência obtida é aquela da cadeia complementar à cadeia que está sendo analisada.

é ilustrado apenas o método de Sanger, o mais fácil tecnicamente e mais difundido. Esse método requer a síntese enzimática de uma cadeia complementar de DNA à cadeia que está sendo analisada, usando um "iniciador" marcado radioativamente e didesoxinucleotídeos.

Desde que esses primeiros métodos práticos de sequenciamento de DNA apareceram, a metodologia melhorou rapidamente. Muito desse avanço foi alimentado pelo Projeto Genoma Humano, descrito no Capítulo 9. Uma variação do método de sequenciamento de Sanger, em que os didesoxinucleotídeos usados para cada reação são marcados com diferentes marcadores fluorescentes coloridos (**Figura 8-34**), foi usada nos esforços iniciais para automatizar grandes esforços de sequenciamento de DNA. Com essa tecnologia, os pesquisadores podem sequenciar moléculas de DNA contendo milhares de nucleotídeos em poucas horas. Essa estratégia foi usada maciçamente nos esforços iniciais para sequenciar genomas inteiros de organismos e é ainda usado para sequenciamento de rotina de genes ou segmentos de DNA. Entretanto, sequenciamentos genômicos modernos usam agora métodos muito mais eficientes, muitas vezes chamados de próxima geração ou **sequenciamento de próxima geração**. Eles estão descritos no Capítulo 9. **Sequenciamento didesóxi de DNA**

## A síntese química de DNA foi automatizada

Um importante avanço prático na química de ácidos nucleicos foi a síntese rápida e precisa de oligonucleotídeos pequenos de sequência conhecida. Os métodos foram desenvolvidos por H. Gobind Khorana e seus colegas nos anos de 1970. Refinamentos introduzidos por Robert Letsinger e Marvin Caruthers conduziram à química agora usada em larga escala, denominada método de fosforamidita (**Figura 8-35**). A síntese é conduzida com a cadeia em crescimento fixada a um suporte sólido, usando fundamentos semelhantes àqueles usados por Merrifield para a síntese de peptídeos (ver Figura 3-32), sendo facilmente automatizada. A eficiência de cada etapa é muito alta, permitindo a síntese rotineira de polímeros contendo 70 ou 80 nucleotídeos e, em alguns laboratórios, cadeias muito mais longas. A disponibilidade de polímeros de DNA relativamente baratos com sequências pré-desenhadas está tendo um impacto poderoso em todas as áreas da bioquímica (Capítulo 9).

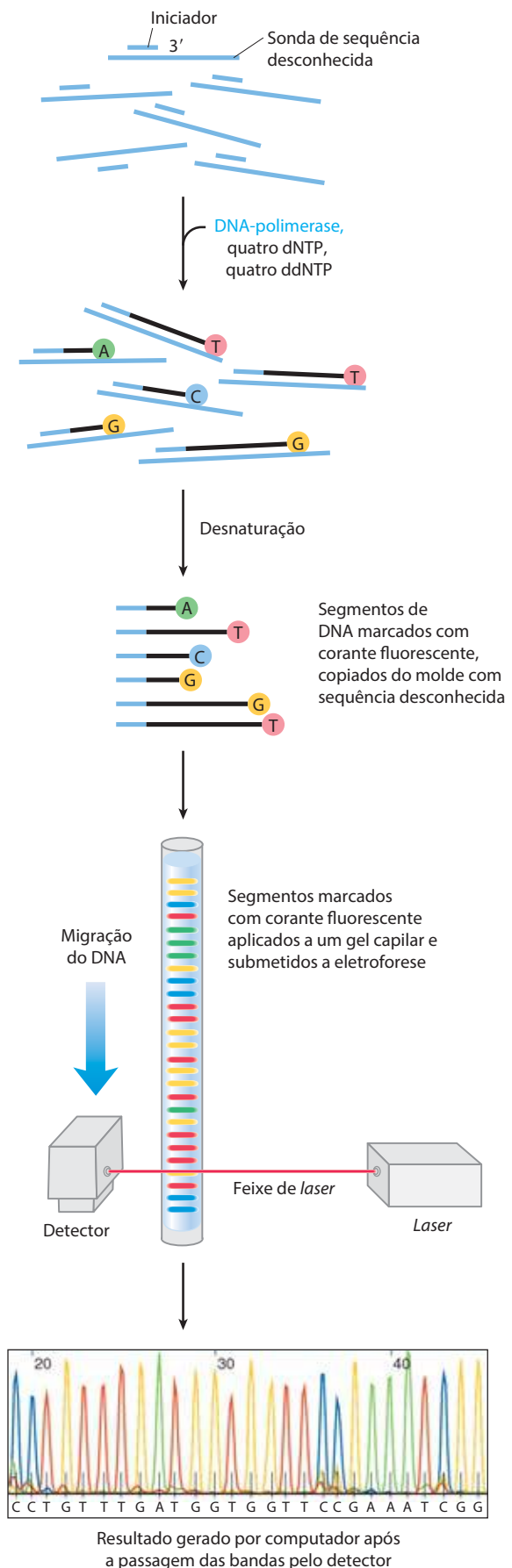



**FIGURA 8-34 Estratégia para automação de reações de sequenciamento de DNA.** Cada didesoxinucleotídeo usado no método de Sanger pode ser acoplado a uma molécula fluorescente que concede uma cor específica a todos os fragmentos terminados naquele nucleotídeo. Todos os quatro ddNTP marcados são adicionados em um tubo único. Os fragmentos de DNA coloridos resultantes são então separados por tamanho em um único gel eletroforético contido em um tubo capilar (aprimoramento da eletroforese em gel que permite separações mais rápidas). Todos os fragmentos de um determinado tamanho migram pelo gel do tubo capilar em um único pico e a cor associada com cada pico é detectada usando um feixe de *laser*. A sequência de DNA é lida pela determinação da sequência de cores nos picos à medida que passam pelo detector. Essa informação é alimentada diretamente a um computador, o qual determina a sequência.

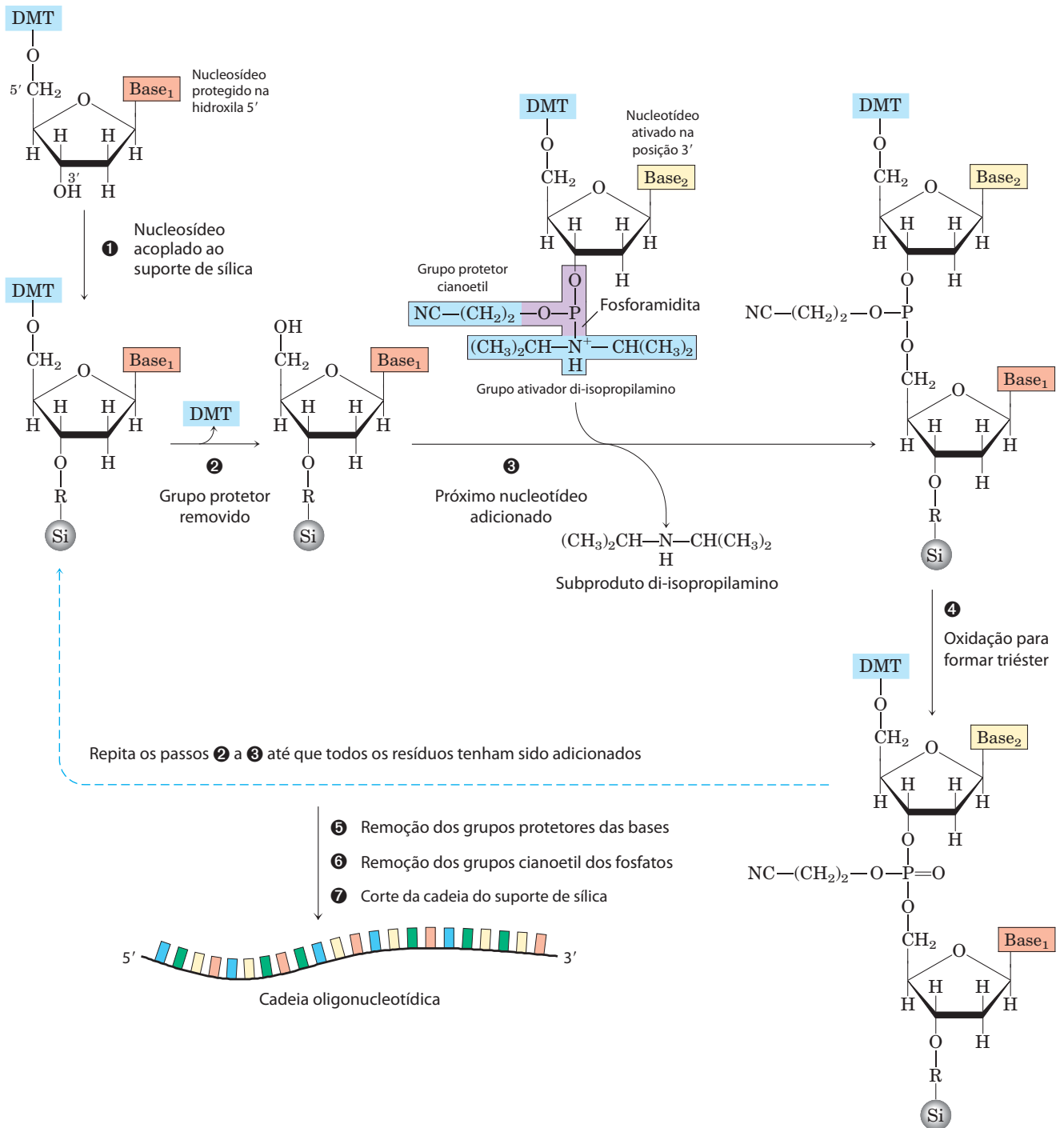



**FIGURA 8-35 Síntese química de DNA pelo método do fosforamidita.** A síntese de DNA automatizada é conceitualmente semelhante à síntese de polipeptídeos em um suporte sólido. O oligonucleotídeo é sintetizado no suporte sólido (sílica), um nucleotídeo por vez, em uma série repetida de reações químicas com precursores nucleotídicos adequadamente protegidos. ❶ O primeiro nucleosídeo (o qual formará a extremidade 3′) é acoplado ao suporte de sílica na hidroxila-3′ (por meio de um grupamento ligante, R), sendo protegido na hidroxila-5′ com um grupo dimetoxitritil (DMT) lábil em ácido. Os grupos reativos em todas as bases também são protegidos quimicamente. ❷ O grupo DMT protetor é removido pela lavagem da coluna com ácido (o grupo DMT é colorido, então essa reação pode ser acompanhada espectrofotometricamente). ❸ O próximo nucleotídeo tem uma fosforamidita na posição 3′: um fosfito trivalente (ao contrário do fosfato pentavalente mais oxidado normalmente presente nos ácidos nucleicos) com um oxigênio ligado substituído por um grupo amino ou uma amina substituída. Na variante comum mostrada, um dos oxigênios da fosforamidita é ligado à desoxirribose, o outro é protegido por um grupo cianoetil e a terceira posição é ocupada pelo grupo di-isopropilamino facilmente deslocável. A reação com o nucleotídeo imobilizado forma uma ligação 5′,3′ e o grupo di-isopropilamino é eliminado. Na etapa ❹, a ligação fosfito é oxidada com iodo para produzir uma ligação fosfotriéster. As reações ❷ a ❹ são repetidas até que todos os nucleotídeos tenham sido adicionados. Em cada etapa, o excesso de nucleotídeos é removido antes da adição do próximo nucleotídeo. Nas etapas ❺ e ❻, os grupos protetores remanescentes nas bases e nos fosfatos são removidos, e no ❼, o oligonucleotídeo é separado do suporte sólido e purificado. A síntese química de RNA é um pouco mais complicada devido à necessidade de proteger o grupo hidroxila 2′ da ribose sem afetar a reatividade do grupo hidroxila 3′.

### RESUMO 8.3 Química dos ácidos nucleicos

- O DNA nativo passa por desenrolamento reversível e separação de cadeias (fusão) sob aquecimento ou em pH extremos. DNAs ricos em pares G≡C têm ponto de fusão maior do que DNAs ricos em pares A═T.
- DNAs de cadeia simples desnaturados de duas espécies podem formar um duplex híbrido, sendo que o grau de hibridização depende da extensão de sequências semelhantes. A hibridização é a base de técnicas importantes usadas no estudo e no isolamento de genes específicos e RNA.
- O DNA é um polímero relativamente estável. Reações espontâneas como a desaminação de certas bases, a hidrólise da ligação *N*-glicosídica base-açúcar, a formação de dímeros de pirimidina induzida por radiação e o dano oxidativo ocorrem em taxas muito baixas, mas são importantes devido à tolerância muito baixa da célula a mudanças no material genético.
- Sequências de DNA podem ser determinadas por uma variedade de métodos modernos.
- Oligonucleotídeos de sequências conhecidas podem ser sintetizados rápida e acuradamente.

## 8.4 Outras funções dos nucleotídeos

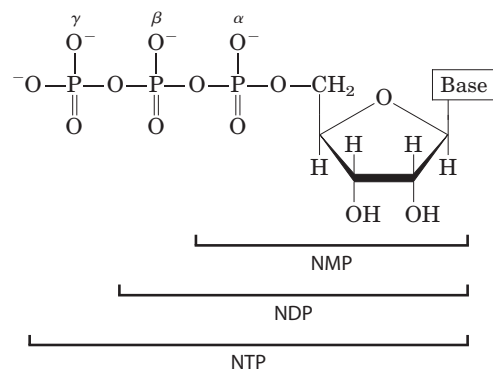
Além das suas funções como subunidades dos ácidos nucleicos, os nucleotídeos têm uma variedade de outras funções em cada célula: como carreadores de energia, componentes de cofatores enzimáticos e mensageiros químicos.

### Os nucleotídeos carregam energia química nas células

O grupo fosfato ligado covalentemente na hidroxila 5′ de um ribonucleotídeo pode ter um ou dois fosfatos adicionais ligados. As moléculas resultantes são conhecidas como nucleosídeos mono, di e trifosfatos (**Figura 8-36**). Iniciando a partir da ribose, os três fosfatos geralmente são rotulados $\alpha$, $\beta$ e $\gamma$. A hidrólise de nucleosídeos trifosfatos produz a energia química para direcionar muitas reações celulares. A adenosina 5′-trifosfato, ATP, é sem dúvida o mais amplamente utilizado em algumas reações, mas UTP, GTP e CTP também são usados em algumas reações. Os nucleosídeos trifosfatos também servem como os precursores ativados na síntese de DNA e de RNA, como descrito nos Capítulos 25 e 26.

A estrutura do grupo trifosfato é a responsável pela energia liberada durante a hidrólise do ATP e de outros nucleosídeos trifosfatos. A ligação entre a ribose e o fosfato $\alpha$ é uma ligação éster. As ligações $\alpha$,$\beta$ e $\beta$,$\gamma$ são fosfoanídricas (**Figura 8-37**). A hidrólise de ligações éster rende cerca de 14 kJ/mol em condições padrão, ao passo que a hidrólise de cada ligação anidrido produz cerca de 30 kJ/mol. A hidrólise do ATP muitas vezes exerce uma função termodinâmica importante na biossíntese. Quando acoplada a uma reação com variação de energia livre positiva, a hidrólise do ATP muda o equilíbrio do processo geral para favorecer a formação do produto (lembre-se da relação entre a constante de equilíbrio e a variação de energia livre descrita pela Equação 6-3 na p. 194).

### Nucleotídeos da adenina são componentes de muitos cofatores enzimáticos

Uma série de cofatores enzimáticos que serve a uma ampla gama de funções químicas inclui a adenosina como parte de suas estruturas (**Figura 8-38**). Eles não são estruturalmente relacionados, exceto pela presença de adenosina. Em nenhum desses cofatores a porção da adenosina participa diretamente da função principal, mas a remoção da adenosina em geral resulta em uma redução drástica da atividade do cofator. Por exemplo, a remoção do nucleotídeo adenina (3′-fosfoadenosina-difosfato) da acetoacetil-CoA, a coenzima A derivada do acetoacetato, reduz sua reatividade como substrato para a $\beta$-cetoacil-CoA-transferase (enzima do metabolismo dos lipídeos) por um fator de $10^6$. Apesar dessa exigência por adenosina não ter sido investigada detalhadamente, ela deve envolver a energia de ligação entre a enzima e o substrato (ou cofator) que é usada na catálise e na estabilização do complexo enzima-substrato inicial (Capítulo 6). No caso da $\beta$-cetoacil-CoA-transferase, a porção nucleotídica da coenzima A parece

| Abreviaturas dos ribonucleosídeos 5′-fosfato | | | |
|---|---|---|---|
| Base | Mono- | Di- | Tri- |
| Adenina | AMP | ADP | ATP |
| Guanina | GMP | GDP | GTP |
| Citosina | CMP | CDP | CTP |
| Uracila | UMP | UDP | UTP |

| Abreviaturas dos desoxirribonucleosídeos 5′-fosfato | | | |
|---|---|---|---|
| Base | Mono- | Di- | Tri- |
| Adenina | dAMP | dADP | dATP |
| Guanina | dGMP | dGDP | dGTP |
| Citosina | dCMP | dCDP | dCTP |
| Timina | dTMP | dTDP | dTTP |

**FIGURA 8-36 Nucleosídeos fosfatos.** Estrutura geral dos nucleosídeos 5′-mono, di e trifosfatos (NMP, NDP e NTP) e suas abreviaturas-padrão. Nos didesoxirribonucleosídeos fosfatos (dNMP, dNDP e dNTP), a pentose é 2′-desóxi-D-ribose.

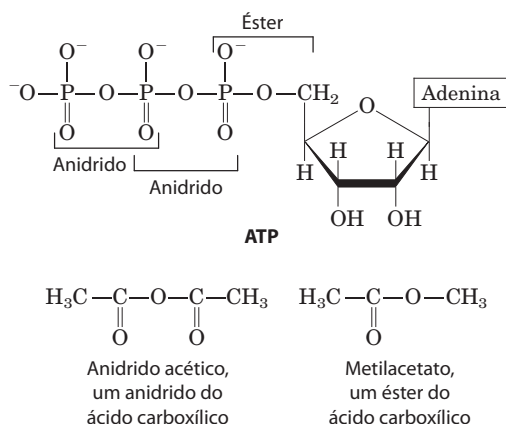



**FIGURA 8-37** **Ligações de éster de fosfato e fosfoanidrido do ATP.** A hidrólise de uma ligação anidrido produz mais energia do que a hidrólise do éster. O anidrido do ácido carboxílico e o éster do ácido carboxílico estão mostrados para comparação.

ser uma "alavanca" de ligação que ajuda a puxar o substrato (acetoacetil-CoA) para o sítio ativo. Funções semelhantes podem ser encontradas para a porção nucleosídica de outros cofatores nucleotídicos.

Por que a adenosina é usada nessas estruturas, em vez de outras moléculas grandes? A resposta nesse caso pode envolver uma forma de economia evolutiva. Certamente a adenosina não é a única que contribui para a quantidade de energia potencial de ligação. A importância da adenosina provavelmente não está tanto em alguma característica química especial, mas na vantagem evolutiva de usar um composto para múltiplas funções. Uma vez que o ATP tornou-se a fonte universal de energia química, foram desenvolvidos sistemas para sintetizar ATP em maior quantidade do que outros nucleotídeos. Por ser abundante, se torna a escolha lógica para a incorporação em uma ampla variedade de estruturas. A economia se estende à estrutu-

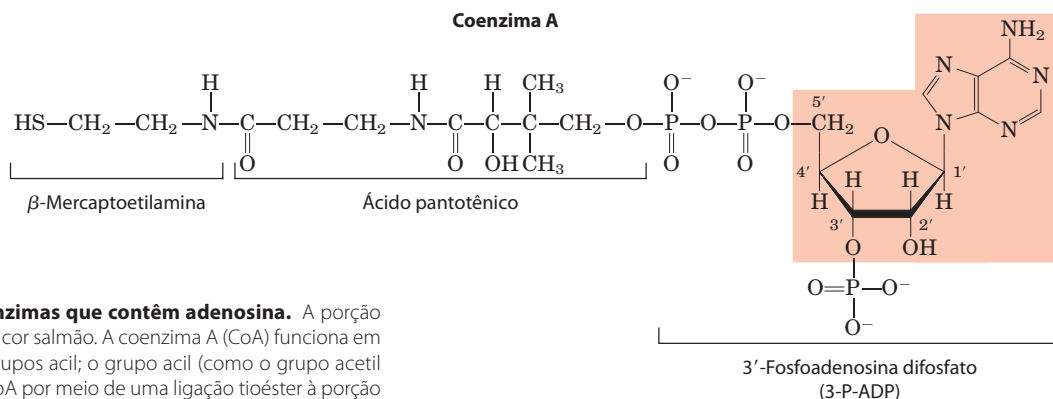
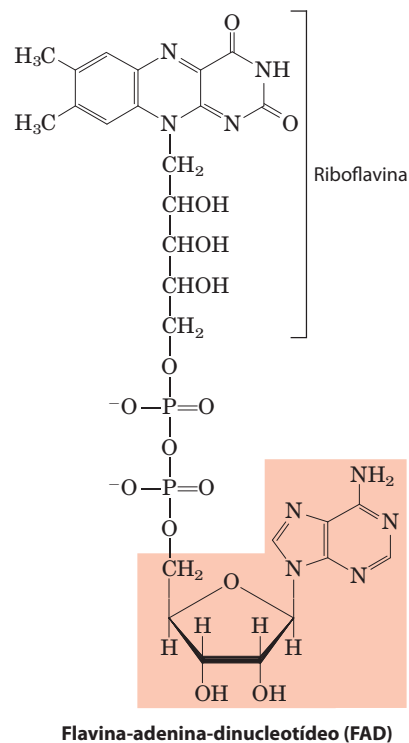
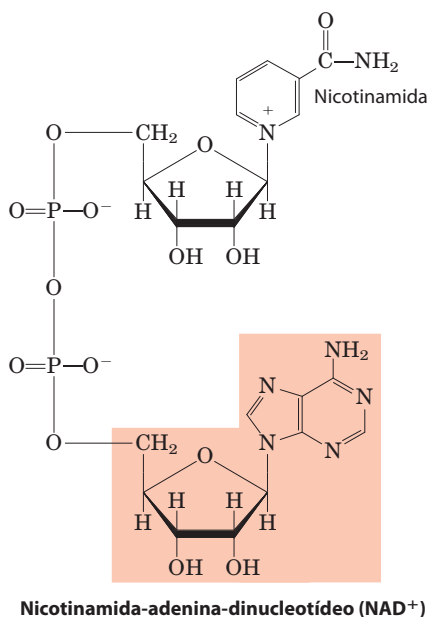



**FIGURA 8-38** **Algumas coenzimas que contêm adenosina.** A porção adenosina está sombreada em cor salmão. A coenzima A (CoA) funciona em reações de transferência de grupos acil; o grupo acil (como o grupo acetil ou acetoacetil) é acoplado à CoA por meio de uma ligação tioéster à porção $\beta$-mercaptoetanolamina. $NAD^+$ atua nas transferências de hidretos e FAD, a forma ativa da vitamina $B_2$ (riboflavina), em transferências de elétrons. Outra coenzima que incorpora adenosina é a 5′-desoxiadenosilcobalamina, a forma ativa da vitamina $B_{12}$ (ver Quadro 17-2), a qual participa em transferências de grupos intramoleculares entre carbonos adjacentes.

ra da proteína. Um domínio proteico único que liga adenosina pode ser usado em enzimas diferentes. Tal domínio, denominado **cavidade de ligação de nucleotídeo,** é encontrado em muitas enzimas que ligam ATP e cofatores nucleotídicos.

## Alguns nucleotídeos são moléculas reguladoras

Células respondem a seu ambiente por receberem avisos dos hormônios ou outros sinais químicos externos. A interação desses sinais químicos extracelulares ("primeiros mensageiros") com receptores na superfície da célula muitas vezes leva à produção de **segundos mensageiros** dentro da célula, os quais, por sua vez, conduzem a mudanças adaptativas no interior da célula (Capítulo 12). Muitas vezes, o segundo mensageiro é um nucleotídeo (**Figura 8-39**). Um dos mais comuns é a **adenosina 3′,5′-monofosfato cíclico** (**AMP cíclico,** ou **cAMP**), formado a partir de ATP em uma reação catalisada pela adenilil-ciclase, uma enzima associada com a face interna da membrana plasmática. O AMP cíclico exerce funções reguladoras em todas as células fora do reino vegetal. A guanosina 3′,5′-monofosfato cíclico (cGMP) ocorre em muitas células e também tem funções reguladoras.

Outro nucleotídeo regulador, ppGpp (Figura 8-39), é produzido em bactérias como resposta a uma redução de velocidade da síntese proteica durante a falta de aminoácidos. Esse nucleotídeo inibe a síntese de moléculas de rRNA e tRNA (ver Figura 28-22) necessárias para a síntese proteica, prevenindo a produção desnecessária desses ácidos nucleicos.

Adenosina 3′, 5′-monofosfato cíclico
(AMP cíclico; cAMP)

Guanosina 3′, 5′-monofosfato cíclico
(GMP cíclico; cGMP)

Guanosina 5′-difosfato, 3′-difosfato
(guanosina tetrafosfato)
(ppGpp)

**FIGURA 8-39 Três nucleotídeos reguladores.**

## RESUMO 8.4 Outras funções dos nucleotídeos

- O ATP é o carregador central de energia química nas células. A presença de uma porção adenosina em uma variedade de cofatores enzimáticos pode ser relacionada a necessidades de energia de ligação.
- O AMP cíclico, formado a partir de ATP em uma reação catalisada pela adenilil-ciclase, é um segundo mensageiro comum produzido em resposta a hormônios e outros sinais químicos.

## Termos-chave

*Os termos em negrito estão definidos no glossário.*

**gene** 281
**RNA ribossômico (rRNA)** 281
**RNA mensageiro (mRNA)** 281
**RNA transportador (tRNA)** 281
**nucleotídeo** 281
**nucleosídeo** 281
**pirimidina** 282
**purina** 282
**desoxirribonucleotídeo** 282
**ribonucleotídeo** 283
**ligação fosfodiéster** 284
**extremidade 5′** 285
**extremidade 3′** 285
**oligonucleotídeo** 286
**polinucleotídeo** 286
**par de bases** 287
sulco maior 289
sulco menor 289
forma B do DNA 291
forma A do DNA 291
forma Z do DNA 291
**palíndromo** 291
**grampo** 292
**cruciforme** 292
triplex de DNA 292
tetraplex G 292
**transcrição** 294
**mRNA monocistrônico** 294
**mRNA policistrônico** 294
**mutação** 299
**segundo mensageiro** 308
**adenosina 3′,5′-monofosfato cíclico (AMP cíclico, cAMP)** 308

## Leituras adicionais

### Geral

**Cox, M.M., Doudna, J.A., & O′Donnell, M.** (2012) *Molecular Biology: Principlas and Practice,* W. H. Freeman and Company, New York.

O melhor lugar para aprofundar o aprendizado sobre a estrutura e a função dos ácidos nucleicos.

**Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R. A., & Ellenberger, T.** (2006) *DNA Repair and Mutagenesis,* 2nd edn, ASM Press, Washington, DC.

Boa fonte de informações adicionais sobre a química de nucleotídeos e ácidos nucleicos.

### Histórico

**Judson, H.F.** (1996) *The Eighth Day of Creation: Makers of the Revolution in Biology,* expanded edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

**Olby, R.C.** (1994) *The Path to the Double Helix: The Discovery of DNA*, Dover Publications, Inc., New York.

**Sayre, A.** (1978) *Rosalind Franklin and DNA,* W.W. Norton & Co., Inc., New York.

**Watson, J.D.** (1968) *The Double Helix: A Personal Account of the Discovery of the Structure of DNA,* Atheneum, New York [Paperback edition, Touchstone Books, 2001.]

### Estrutura dos ácidos nucleicos

**Frank-Kamenetskii, M.D. & Mirkin, S.M.** (1995) Triplex DNA structures. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 65-95.

**Holbrook, S.R.** (2008) Structural principles from large RNA. *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 445-464.

**Keniry, M.A.** (2000) Quadruplex structures in nucleic acids. *Biopolymers* **56**, 123-146.
Bom resumo das propriedades estruturais dos quadruplex.

### Química dos ácidos nucleicos

**Bonetta, L.** (2006) Genome sequencing in the fast Lane. *Nat. Methods* **3**, 141-147.
Este artigo introduz uma nova geração de métodos de sequenciamento descritos no Capítulo 9.

**Collins, A.R.** (1999) Oxidative damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* **21**, 238-246.

**Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., & Lunt, J.** (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* **17**, 1195-1214.

**Imlay, J.A.** (2008) Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 755–776.

**Marnett, L.J. & Plastaras, J.P.** (2001) Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet.* **17**, 214-221.

### ATP como carreador de energia

**Jencks, W.P.** (1987) Economics of enzyme catalysis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52**, 65-73.
Artigo relativamente curto, mas cheio de conhecimentos.


## Problemas

**1. Estrutura de nucleotídeos.** Quais posições no anel purínico dos nucleotídeos purínicos do DNA têm potencial para formar ligações de hidrogênio, mas não estão envolvidas no pareamento de base de Watson-Crick?

**2. Sequência de bases das fitas de DNA complementar.** Uma cadeia de um DNA de fita dupla tem a sequência (5′)GCGCAATATTTCTCAAAATATTGCGC(3′). Escreva a sequência de bases da fita complementar. Que tipo especial de sequência está contido nesse segmento de DNA? O DNA de cadeia dupla tem potencial para formar algumas estruturas alternativas?

**3. DNA do corpo humano.** Calcule o peso em gramas de uma molécula de DNA de fita dupla esticada da Terra até a Lua (~320.000 km). A dupla-hélice de DNA pesa em torno de $1 \times 10^{-18}$ g por 1.000 pares de nucleotídeos; cada par de bases abrange 3,4 Å. Para uma comparação interessante, seu corpo contém aproximadamente 0,5 g de DNA!

**4. Enovelamento do DNA.** Assuma que um trecho de poli(A) de cinco pares de bases produz um enovelamento de 20º em uma cadeia de DNA. Calcule o enovelamento total (líquido) produzido no DNA se o par de bases do centro (o terceiro dos cinco) de dois trechos $(dA)_5$ sucessivos estiver localizado (a) a uma distância de 10 pares de bases; (b) a uma distância de 15 pares de bases. Assuma 10 pares de bases por volta na dupla-hélice de DNA.

**5. Distinção entre estrutura de DNA e estrutura de RNA.** Grampos podem ser formados na sequência palindrômica de cadeia única de ambos RNA ou DNA. Qual é a diferença entre estrutura helicoidal de um grampo longo e completamente pareado (exceto na extremidade) no RNA e um grampo semelhante no DNA?

**6. Química de nucleotídeos.** As células de muitos organismos eucarióticos têm sistemas altamente especializados que reparam especificamente pareamentos incorretos G-T no DNA. O pareamento incorreto é reparado para formar o par de bases G≡C (não A═T). Esse mecanismo de reparo do pareamento incorreto G-T ocorre além de um sistema mais geral que repara quase todos os pareamentos incorretos. Sugira por que as células necessitam de um sistema especializado para reparar o pareamento incorreto G-T.

**7. Desnaturação de ácidos nucleicos.** Um oligonucleotídeo de duplex de DNA em que uma das cadeias tem a sequência TAATACGACTCACTATAGGG tem temperatura de fusão ($t_m$) de 59°C. Se um oligonucleotídeo de duplex de RNA de sequência idêntica (substituindo U por T) é sintetizado, a temperatura de fusão será mais alta ou mais baixa?

**8. Dano espontâneo no DNA.** A hidrólise da ligação *N*-glicosídica entre a desoxirribose e uma purina no DNA cria um sítio AP. Um sítio AP gera uma desestabilização termodinâmica maior do que a criada por qualquer pareamento incorreto no DNA. Esse efeito não está completamente elucidado. Examine a estrutura de um sítio AP (ver Figura 8-30b) e descreva algumas consequências químicas dessa perda da base.

**9. Predição da estrutura de ácido nucleico a partir de sua sequência.** Parte de um cromossomo sequenciado tem a sequência (em uma fita) ATTGCATCCGCGCGTGCGCGCGCGATCCCGTTACTTTCCG. Qual parte dessa sequência é a mais provável de assumir a conformação Z?

**10. Estrutura do ácido nucleico.** Explique por que a absorção de luz UV pelo DNA de fita dupla aumenta (efeito hipercrômico) quando o DNA é desnaturado.

**11. Determinação de concentração de proteína em uma solução contendo proteínas e ácidos nucleicos.** A concentração de proteína ou ácidos nucleicos em uma solução contendo ambos pode ser estimada pelo uso de suas diferentes propriedades de absorção de luz: proteínas absorvem mais intensamente em 280 nm e ácidos nucleicos em 260 nm. Estimativas de suas respectivas concentrações em uma mistura podem ser feitas medindo a absorbância ($A$) da solução a 280 e 260 nm e usando a tabela na próxima página, a qual dá $R_{280/260}$, a razão das absorbâncias a 280 e 260 nm, a porcentagem da massa total que é ácido nucleico e o fator, $F$, que corrige a leitura a $A_{280}$ e dá uma estimativa mais correta de proteína. A concentração de proteína (em mg/mL) $= F \times A_{280}$ (supondo que a cubeta tenha um caminho óptico de 1 cm). Calcule a concentração de proteína em uma solução de $A_{280} = 0{,}69$ e $A_{260} = 0{,}94$.

| $R_{280/260}$ | Proporção de ácido nucleico (%) | *F* |
|---|---|---|
| 1,75 | 0,00 | 1,116 |
| 1,63 | 0,25 | 1,081 |
| 1,52 | 0,50 | 1,054 |
| 1,40 | 0,75 | 1,023 |
| 1,36 | 1,00 | 0,994 |
| 1,30 | 1,25 | 0,970 |
| 1,25 | 1,50 | 0,944 |
| 1,16 | 2,00 | 0,899 |
| 1,09 | 2,50 | 0,852 |
| 1,03 | 3,00 | 0,814 |
| 0,979 | 3,50 | 0,776 |
| 0,939 | 4,00 | 0,743 |
| 0,874 | 5,00 | 0,682 |
| 0,846 | 5,50 | 0,656 |
| 0,822 | 6,00 | 0,632 |
| 0,804 | 6,50 | 0,607 |
| 0,784 | 7,00 | 0,585 |
| 0,767 | 7,50 | 0,565 |
| 0,753 | 8,00 | 0,545 |
| 0,730 | 9,00 | 0,508 |
| 0,705 | 10,00 | 0,478 |
| 0,671 | 12,00 | 0,422 |
| 0,644 | 14,00 | 0,377 |
| 0,615 | 17,00 | 0,322 |
| 0,595 | 20,00 | 0,278 |

**12. Solubilidade dos componentes de DNA.** Desenhe as seguintes estruturas e ordene suas solubilidades relativas em água (desde a mais solúvel até a menos solúvel): desoxirribose, guanina, fosfato. Como essas solubilidades são consistentes com a estrutura tridimensional do DNA de fita dupla?

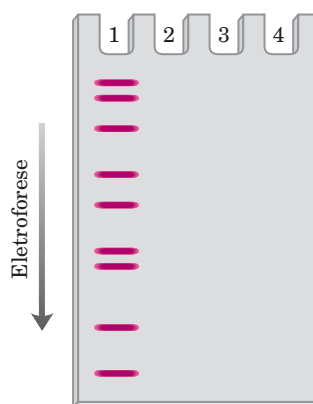
**13. Lógica do sequenciamento de Sanger.** No método de Sanger (didesóxi) para sequenciamento de DNA, uma pequena quantidade de didesoxirribonucleotídeo trifosfato – como ddCTP – é adicionada à reação de sequenciamento junto com uma grande quantidade do correspondente dCTP. Qual seria o resultado esperado se o dCTP fosse omitido?

**14. Sequenciamento de DNA.** O seguinte fragmento de DNA foi sequenciado pelo método de Sanger. O asterisco vermelho indica um marcador fluorescente.

*5′ ———— 3′-OH
3′ ———— ATTACGCAAGGACATTAGAC---5′

Uma amostra de DNA reagiu com a DNA-polimerase e com cada uma das misturas de nucleotídeos (em tampão apropriado) listadas abaixo. Didesoxinucleotídeos (ddNTP) foram adicionados em quantidades relativamente pequenas.

1. dATP, dTTP, dCTP, dGTP, ddTTP
2. dATP, dTTP, dCTP, dGTP, ddGTP
3. dATP, dCTP, dGTP, ddTTP
4. dATP, dTTP, dCTP, dGTP

O DNA resultante da reação foi separado por eletroforese em gel de agarose e foram localizadas as bandas fluorescentes. O padrão de bandas resultante da mistura de nucleotídeos 1 está abaixo. Supondo que todas as misturas fossem separadas no mesmo gel, qual seria a aparência das canaletas 2, 3 e 4?

**15. Fosfodiesterase de veneno de serpentes.** Uma exonuclease é uma enzima que cliva nucleotídeos sequencialmente a partir da extremidade de uma cadeia polinucleotídica. A fosfodiesterase de veneno de serpentes, a qual hidrolisa nucleotídeos a partir da extremidade 3′ de qualquer nucleotídeo com um grupo 3′-hidroxila livre, cliva entre o 3′ hidroxila da ribose ou da desoxirribose e o grupo fosforil do próximo nucleotídeo. Ela age no RNA ou DNA de cadeia simples e não tem especificidade de base. Essa enzima foi usada em experimentos de determinação de sequência antes do desenvolvimento de técnicas modernas de sequenciamento de ácidos nucleicos. Quais são os produtos da digestão parcial pela fosfodiesterase de veneno de serpente de um oligonucleotídeo com a seguinte sequência?

(5′)GCGCCAUUGC(3′)—OH

**16. Preservação do DNA em endosporos bacterianos.** Os endosporos de bactérias se formam quando o ambiente não mais permite o metabolismo celular ativo. Na bactéria de solo *Bacillus subtilis*, por exemplo, o processo de esporulação começa quando um ou mais nutrientes estiverem esgotados. O produto final é uma estrutura pequena e metabolicamente dormente que pode sobreviver quase que indefinidamente sem nenhum metabolismo detectável. Os esporos têm mecanismos que evitam o acúmulo de mutações potencialmente letais no seu metabolismo por períodos de dormência que podem ultrapassar 1.000 anos. Os esporos de *B. subtilis* são muito mais resistentes ao calor, à radiação UV e a agentes oxidantes (agentes mutagênicos), todos eles promovem mutações, do que a bactéria em crescimento.

(a) Um fator que evita potencial dano ao DNA é a grande diminuição no seu conteúdo de água. Como isso afetaria alguns tipos de mutações?

(b) Os endosporos têm uma categoria de proteínas denominada pequenas proteínas solúveis em ácido (SASP, do inglês *small acid-soluble proteins*), que se ligam ao DNA, evitando a formação de dímeros do tipo ciclobutano. O que causa a formação de dímeros de ciclobutano e por que os endosporos de bactérias necessitam de mecanismos que previnam a sua formação?

**17. Síntese de oligonucleotídeos.** No esquema da Figura 8-35, cada nova base a ser adicionada ao oligonucleotídeo que está sendo alongado é modificada de forma que o seu grupo 3′ hidroxila é ativado e o grupo 5′ hidroxila está ligado a um grupo dimetoxitritil (DMT). Qual é a função do grupo DMT na base que está sendo adicionada?

## Bioquímica na internet

**18. A estrutura do DNA.** A elucidação da estrutura tridimensional do DNA ajudou os pesquisadores a entender como essa molécula carrega informação que pode ser fielmente replicada de uma geração para a próxima. Para ver a estrutura secundária do DNA de fita dupla, vá ao site do Protein Data Bank (www.pdb.org). Use os identificadores do PDB listados abaixo para ver os resumos da estrutura para as duas formas de DNA. Abra as estruturas usando Jmol (ligado ao *Display Options*) e use os controles no menu do Jmol (acessado com o *control-click* ou clique no logo do Jmol no canto inferior direito da tela do monitor) para completar os exercícios a seguir. Recorra ao *link* de ajuda do Jmol se necessário.

(a) Obtenha o arquivo da 141D, uma sequência de DNA altamente conservada e repetitiva da extremidade do genoma do HIV-1 (o vírus que causa a Aids). Mostre a molécula na forma de estrutura de esfera e bastão e os elementos em cores diferentes. Identifique o esqueleto açúcar-fosfato para cada cadeia do duplex de DNA. Localize e identifique bases individuais. Identifique a extremidade 5′ de cada cadeia. Localize o sulco maior e o sulco menor. Essa hélice está voltada para a direita ou para a esquerda?

(b) Obtenha o arquivo da 145D, um DNA com a conformação Z. Mostre a molécula como na forma de estrutura de esfera e bastão e os elementos em cores diferentes. Identifique o esqueleto açúcar-fosfato para cada cadeia do duplex de DNA. Essa hélice está voltada para a direita ou para a esquerda?

(c) Para avaliar precisamente a estrutura secundária de DNA, ver molécula na forma tridimensional. No *control menu*, escolha *Select > All*, então *Style > Stereographic > Cross-eye* ou *Wall-eye*. Você verá duas imagens da molécula de DNA. Coloque o seu nariz a aproximadamente 25 centímetros do monitor e olhe a ponta do seu nariz (com os olhos cruzados) ou as margens opostas da tela do monitor (com os olhos para os lados). No fundo você poderá ver três imagens da hélice de DNA. Mude o foco do olhar para a imagem do meio, que aparecerá em três dimensões. (Lembre-se que apenas um dos dois autores deste livro consegue fazer isso.)

## Problema de análise de dados

**19. Estudos de Chargaff da estrutura do DNA** A seção do capítulo "DNA é uma dupla-hélice que armazena informação genética" inclui um resumo dos principais achados de Erwin Chargaff e seus colegas, listados como quatro conclusões ("Regras de Chargaff", p. 288). Neste problema, você irá examinar os dados que Chargaff coletou para sustentar essas conclusões.

Em um artigo, Chargaff (1950) descreveu seus métodos analíticos e alguns resultados preliminares. Resumidamente, ele tratou as amostras de DNA com ácido para remover as bases, separou as bases por cromatografia de papel e mediu a quantidade de cada base por espectroscopia de UV. Seus resultados estão mostrados nas três tabelas a seguir. A **relação molar** é a razão entre o número de moles de cada base na amostra pelo número de moles de fosfato na amostra – isso dá a fração do número total de bases representada por cada base específica. O *rendimento* é a soma das quatro bases (a soma das relações molares). A recuperação completa de todas as bases no DNA daria um rendimento de 1,0.

**Relação molar no DNA de boi**

| | Timo | | | Baço | | Fígado |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Base** | **Prep. 1** | **Prep. 2** | **Prep. 3** | **Prep. 1** | **Prep. 2** | **Prep. 1** |
| Adenina | 0,26 | 0,28 | 0,30 | 0,25 | 0,26 | 0,26 |
| Guanina | 0,21 | 0,24 | 0,22 | 0,20 | 0,21 | 0,20 |
| Citosina | 0,16 | 0,18 | 0,17 | 0,15 | 0,17 | |
| Timina | 0,25 | 0,24 | 0,25 | 0,24 | 0,24 | |
| *Rendimento* | *0,88* | *0,94* | *0,94* | *0,84* | *0,88* | |

**Relação molar no DNA humano**

| | Esperma | | Timo | Fígado | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Base** | **Prep. 1** | **Prep. 2** | **Prep. 1** | **Normal** | **Carcinoma** |
| Adenina | 0,29 | 0,27 | 0,28 | 0,27 | 0,27 |
| Guanina | 0,18 | 0,17 | 0,19 | 0,19 | 0,18 |
| Citosina | 0,18 | 0,18 | 0,16 | | 0,15 |
| Timina | 0,31 | 0,30 | 0,28 | | 0,27 |
| *Rendimento* | *0,96* | *0,92* | *0,91* | | *0,87* |

**Relação molar no DNA de microrganismos**

| | Levedura | | Bacilo da tuberculose aviária |
|---|---|---|---|
| **Base** | **Prep. 1** | **Prep. 2** | **Prep. 1** |
| Adenina | 0,24 | 0,30 | 0,12 |
| Guanina | 0,14 | 0,18 | 0,28 |
| Citosina | 0,13 | 0,15 | 0,26 |
| Timina | 0,25 | 0,29 | 0,11 |
| *Rendimento* | *0,76* | *0,92* | *0,77* |

(a) Com base nestes dados, Chargaff concluiu que "até agora nenhuma diferença foi encontrada na composição do DNA dos diferentes tecidos de uma mesma espécie". Isso corresponde à conclusão 2 mencionada neste capítulo. Entretanto, uma visão cética dos mesmos dados poderia concluir: com certeza, eles parecem diferentes! Se você fosse Chargaff, como usaria os dados para convencer algum cético a mudar de ideia?

(b) A composição de bases do DNA de células hepáticas normais e de células hepáticas cancerosas (hepatocarcinoma) não foi significativamente diferente. Você esperaria que a técnica de Chargaff fosse capaz de detectar uma diferença entre o DNA de células normais e o de células cancerosas? Justifique a sua explicação.

Como você pode imaginar, os dados de Chargaff não foram completamente convincentes. Ele continuou a aprimorar suas técnicas, como descrito no artigo posterior (Chargaff, 1951), em que ele descreveu relações molares de bases no DNA de vários organismos:

| Fonte | A:G | T:C | A:T | G:C | Purina:pirimidina |
|---|---|---|---|---|---|
| Boi | 1,29 | 1,43 | 1,04 | 1,00 | 1,1 |
| Humanos | 1,56 | 1,75 | 1,00 | 1,00 | 1,0 |
| Galinha | 1,45 | 1,29 | 1,06 | 0,91 | 0,99 |
| Salmão | 1,43 | 1,43 | 1,02 | 1,02 | 1,02 |
| Trigo | 1,22 | 1,18 | 1,00 | 0,97 | 0,99 |
| Levedura | 1,67 | 1,92 | 1,03 | 1,20 | 1,0 |
| *Haemophilus influenzae* tipo c | 1,74 | 1,54 | 1,07 | 0,91 | 1,0 |
| *E. coli* K-12 | 1,05 | 0,95 | 1,09 | 0,99 | 1,0 |
| Bacilo da tuberculose aviária | 0,4 | 0,4 | 1,09 | 1,08 | 1,1 |
| *Serratia marcescens* | 0,7 | 0,7 | 0,95 | 0,86 | 0,9 |
| *Bacillus schatz* | 0,7 | 0,6 | 1,12 | 0,89 | 1,0 |

(c) De acordo com Chargaff, como exposto na conclusão 1 neste capítulo, "A composição de bases do DNA geralmente varia de uma espécie para a outra". Dê um argumento, com base nos dados apresentados até agora, que sustente essa conclusão.

(d) De acordo com a conclusão 4, "Em todos os DNA celulares, independentemente da espécie... A + G = T + C". Dê um argumento, com base nos dados apresentados até agora, que sustente essa conclusão.

Parte da intenção de Chargaff foi refutar a "hipótese do tetranucleotídeo". Essa era a ideia de que o DNA era um polímero monótono de tetranucleotídeos $(AGCT)_n$ e, portanto, incapaz de conter informação de sequências. Apesar de os dados apresentados anteriormente demonstrarem que o DNA não pode ser simplesmente um tetranucleotídeo – se fosse, todas as amostras teriam relações molares de 0,25 para cada base –, ainda seria possível que o DNA de diferentes organismos fosse levemente mais complexo na forma de sequências repetidas, mas ainda monótono.

Para tratar dessa questão, Chargaff pegou DNA de germe de trigo e o tratou com a enzima desoxirribonuclease por diferentes períodos. Em cada intervalo de tempo, uma parte do DNA foi convertida a fragmentos pequenos, e os fragmentos grandes restantes foram chamados de "cerne". Na tabela abaixo, o percentual de "19% do cerne" corresponde aos fragmentos grandes remanescentes quando 81% do DNA foram degradados; "8% do cerne" correspondem aos fragmentos grandes remanescentes após 92% de degradação.

| Base | DNA intacto | 19% do cerne | 8% do cerne |
|---|---|---|---|
| Adenina | 0,27 | 0,33 | 0,35 |
| Guanina | 0,22 | 0,20 | 0,20 |
| Citosina | 0,22 | 0,16 | 0,14 |
| Timina | 0,27 | 0,26 | 0,23 |
| *Rendimento* | *0,98* | *0,95* | *0,92* |

(e) Como você usaria esses dados para argumentar que o DNA de germe de trigo não é uma sequência repetitiva monótona?

## Referências

**Chargaff, E.** (1950) Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymic degradation. *Experimentia* **6**, 201-209.

**Chargaff, E.** (1951) Structure and function of nucleic acids as cell constituents. *Fed. Proc.* **10**, 654-659.

9

# Tecnologias da Informação com Base no DNA



A complexidade das moléculas e dos sistemas apresentados neste livro pode, algumas vezes, ocultar uma realidade bioquímica – o que se aprendeu é apenas o começo. Novos lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos são descobertos a cada dia e, com frequência, não se tem nenhuma ideia sobre suas funções. Quantos ainda serão descobertos e quais serão suas funções? Até mesmo moléculas bem caracterizadas continuam a desafiar os pesquisadores com inúmeras questões mecânicas e funcionais não resolvidas. Os milhares de sequências genômicas completas já conhecidas fornecem uma estimativa da imensidão da tarefa à frente. Simplesmente não são conhecidas as funções da maior parte do DNA – em geral, incluindo a metade ou mais dos genes – em um genoma típico. Essas mesmas sequências genômicas também fornecem uma oportunidade sem precedentes. Não há maior fonte de informações sobre uma célula ou organismo do que as inseridas em seu próprio DNA. A tarefa de extrair essas informações originou sofisticadas tecnologias com base no DNA que agora estão no centro de quase toda a história da bioquímica. Essas tecnologias serão abordadas em cada um dos tópicos explorados nos próximos capítulos.

Como objetos de estudo, as moléculas de DNA apresentam um problema especial – seu tamanho. Sem dúvida, os cromossomos são as maiores biomoléculas na célula. Como um pesquisador descobre a informação que procura quando só uma pequena parte de um cromossomo inclui milhões ou até bilhões de pares de bases contíguos? Soluções para esses problemas começaram a surgir na década de 1970.

Décadas de avanços por milhares de cientistas que trabalham em genética, bioquímica, biologia celular e físico-química se uniram nos laboratórios de Paul Berg, Herbert Boyer e Stanley Cohen para produzir técnicas de detecção, isolamento, preparação e estudo de pequenos segmentos de DNA derivados de cromossomos muito maiores. As técnicas para a clonagem de DNA pavimentaram o caminho para o moderno campo da **genômica** e, de forma mais ampla, para muitas das tecnologias que contribuem para a **biologia de sistemas**, o estudo da bioquímica na escala de todas as células e organismos.

Cada aluno ou instrutor, quando considera os temas apresentados neste capítulo, depara-se com um conflito. Primeiro, os métodos aqui descritos foram possíveis graças aos avanços na compreensão do metabolismo do DNA e do RNA. Assim, é preciso entender alguns conceitos fundamentais da replicação do DNA, transcrição do RNA, síntese de proteínas e regulação gênica para entender como esses métodos funcionam. Ao mesmo tempo, no entanto, a bioquímica moderna se baseia nesses mesmos métodos, de modo que uma abordagem atual sobre qualquer aspecto da disciplina torna-se muito difícil sem uma introdução adequada a eles. Apresentar esses métodos no início do livro é reconhecer que eles estão intrinsecamente interligados tanto aos avanços que lhes deram origem quanto às mais novas descobertas que eles hoje tornam possíveis. Esses conceitos básicos e necessários fazem da presente discussão não apenas uma introdução à tecnologia, mas também uma prévia de muitos dos fundamentos da bioquímica do DNA e do RNA encontrados em capítulos posteriores.

Inicialmente são destacados os princípios de clonagem do DNA e, em seguida, ilustrados a variedade de aplicações

Paul Berg

Herbert Boyer

Stanley N. Cohen

e o potencial de muitas das tecnologias mais recentes que apoiam e aceleram o avanço da bioquímica.

## 9.1 Estudo dos genes e seus produtos

Uma pesquisadora isolou uma nova enzima que é a chave para uma doença humana. Ela espera isolar grandes quantidades da proteína a fim de cristalizá-la para seu estudo e análise estrutural. Deseja alterar os resíduos de aminoácidos em seu sítio ativo para compreender a reação que a enzima catalisa. Ela prepara um sofisticado programa de pesquisa para elucidar como essa enzima interage e é regulada por outras proteínas na célula. Tudo isso, e muito mais, se torna possível se ela conseguir obter o gene que codifica sua enzima. Infelizmente, esse gene tem apenas alguns milhares de pares de bases no interior de um cromossomo humano, com um tamanho medido em centenas de milhares de pares de bases. Como ela vai isolar o pequeno segmento de que necessita e, então, estudá-lo? A resposta encontra-se na clonagem do DNA e em métodos desenvolvidos para manipular genes clonados.

### Genes podem ser isolados por clonagem do DNA

Um *clone* é uma cópia idêntica. Esse termo foi originalmente aplicado a células de um único tipo, isoladas e cultivadas para criar uma população de células idênticas. Quando aplicado ao DNA, um clone representa muitas cópias idênticas de um segmento particular do gene. Em resumo, a pesquisadora deve cortar o gene do cromossomo maior, anexá-lo a uma porção muito menor de DNA transportador e permitir que microrganismos façam muitas cópias dessa porção para ela. Esse é o processo de **clonagem de DNA**. O resultado é a amplificação seletiva de um determinado gene ou segmento de DNA, facilitando seu isolamento e estudo. Classicamente, a clonagem de DNA a partir de qualquer organismo envolve cinco procedimentos gerais:

1. *Cortar o DNA-alvo em locais precisos*. Endonucleases específicas de sequência (endonucleases de restrição) fornecem as tesouras moleculares necessárias.
2. *Selecionar uma pequena molécula transportadora de DNA capaz de autorreplicação*. Esses DNAs são chamados **vetores de clonagem** (vetores são agentes de entrega). São geralmente plasmídeos ou DNAs virais.
3. *Juntar dois fragmentos de DNA de modo covalente*. A enzima DNA-ligase liga o vetor de clonagem e o DNA a ser clonado. Moléculas de DNA compostas por segmentos ligados de modo covalente a partir de duas ou mais fontes são chamadas de **DNAs recombinantes**.
4. *Transportar o DNA recombinante do tubo de ensaio para uma célula hospedeira* que irá proporcionar a maquinaria enzimática para a replicação do DNA.
5. *Selecionar ou identificar as células hospedeiras que contêm DNA recombinante.*

Os métodos utilizados para realizar essas e outras tarefas relacionadas são coletivamente chamados de **tecnologia do DNA recombinante** ou, de modo mais informal, de **engenharia genética**.

Grande parte dessa discussão inicial incidirá sobre a clonagem de DNA na bactéria *Escherichia coli*, o primeiro organismo utilizado para o trabalho de DNA recombinante e ainda a célula hospedeira mais comum. A *E. coli* apresenta muitas vantagens: o metabolismo do seu DNA (como muitos outros de seus processos bioquímicos) é bem compreendido; muitos vetores de clonagem que ocorrem naturalmente associados à *E. coli*, como plasmídeos e bacteriófagos (vírus bacterianos, também chamado de fagos), são bem caracterizados; e existem técnicas para transportar o DNA rapidamente de uma célula bacteriana a outra. Os princípios aqui discutidos são amplamente aplicáveis à clonagem de DNA em outros organismos, tópico discutido em mais detalhes adiante na seção.

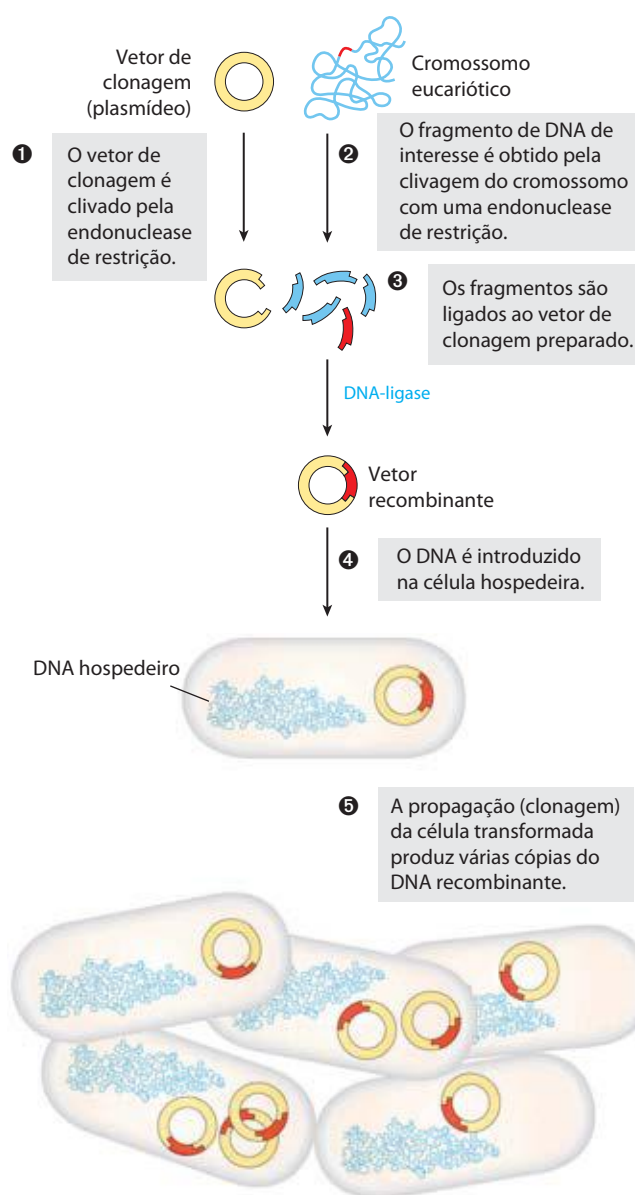
### Endonucleases de restrição e DNA-ligases produzem DNA recombinante

Particularmente importante para a tecnologia do DNA recombinante é um conjunto de enzimas (Tabela 9-1) que se tornou disponível ao longo de décadas de pesquisa sobre o metabolismo de ácidos nucleicos. Duas classes de enzimas estão no centro da abordagem clássica para a geração e propagação da molécula de DNA recombinante (**Figura 9-1**). Em primeiro lugar, as **endonucleases de restrição** (também chamadas de enzimas de restrição) reconhecem e clivam o DNA em sequências específicas (sequências de reconhecimento ou sítios de restrição) para gerar um conjunto de fragmentos menores. Em segundo lugar, o fragmento do DNA a ser clonado é unido a um vetor de clonagem adequado, por meio de **DNA-ligases**, para ligar as moléculas de DNA. O vetor recombinante é então introduzido em uma célula hospedeira que amplifica o fragmento no curso de muitas gerações de divisão celular.

Endonucleases de restrição são encontradas em um grande número de espécies bacterianas. No início da década de 1960, Werner Arber descobriu que a função biológica dessas enzimas consiste em reconhecer e clivar o DNA exógeno (o DNA de um vírus infeccioso, por exemplo); afirma-se que tal DNA está *restrito*. No DNA da célula hospedeira, a sequência que poderia ser reconhecida por sua própria endonuclease de restrição é protegida da digestão pela metilação do DNA, catalisada por uma metilase específica. A endonuclease de restrição e a metilase correspondente são chamadas algumas vezes de **sistema de restrição-modificação**.

Há três tipos de endonucleases de restrição, designadas I, II e III. Os tipos I e III são complexos geralmente grandes com múltiplas subunidades, contendo atividades tanto de endonuclease quanto de metilase. As endonucleases de restrição tipo I clivam o DNA em sítios aleatórios que podem estar a mais de 1.000 pares de base (pb) da sequência de reconhecimento. As endonucleases de restrição tipo III clivam o DNA a cerca de 25 pb da sequência de reconhecimento. Ambos os tipos se movem ao longo

**TABELA 9-1** Algumas enzimas usadas na tecnologia do DNA recombinante

| Enzima(s) | Função |
|---|---|
| Endonucleases de restrição tipo II | Clivam DNA em sequências de bases específicas |
| DNA-ligase | Liga duas moléculas ou fragmentos de DNA |
| DNA-polimerase I (*E. coli*) | Preenche lacunas em DNA de fita dupla com adição de nucleotídeos às extremidades 3′ |
| Transcriptase reversa | Faz uma cópia de DNA a partir de uma molécula de RNA |
| Polinucleotídeo-cinase | Adiciona um fosfato à extremidade 5′-OH de um polinucleotídeo para marcá-la ou permitir ligação |
| Terminal-transferase | Adiciona caudas de homopolímeros às extremidades 3′-OH de um duplex linear |
| Exonuclease III | Remove resíduos nucleotídicos das extremidades 3′ de uma fita de DNA |
| Exonuclease do bacteriófago λ | Remove resíduos nucleotídicos das extremidades 5′ de um duplex de DNA para expor as extremidades 3′ de fita simples |
| Fosfatase alcalina | Remove fosfatos terminais das extremidades 5′ou 3′ (ou ambas) |

do DNA em uma reação que precisa da energia do ATP. As **endonucleases de restrição tipo II**, isoladas pela primeira vez por Hamilton Smith em 1970, são mais simples, não requerem ATP e catalisam a clivagem hidrolítica de ligações fosfodiésteres específicas no DNA dentro da própria sequência de reconhecimento. A extraordinária utilidade desse grupo de endonucleases de restrição foi demonstrada por Daniel Nathans, que primeiro as utilizou para desenvolver novos métodos de mapeamento e análise de genes e genomas.

Milhares de endonucleases de restrição tipo II foram descobertas em diferentes espécies bacterianas, e mais de 100 sequências de DNA diferentes são reconhecidas por uma ou mais dessas enzimas. As sequências de reconhecimento têm em geral 4 a 6 pb de comprimento e são palindrômicas (ver Figura 8-18). A Tabela 9-2 lista as sequências reconhecidas por algumas endonucleases tipo II.

Algumas endonucleases de restrição fazem cortes coordenados nas duas fitas do DNA, deixando dois a quatro nucleotídeos de uma fita sem par em cada extremidade resultante. Essas fitas sem pares são chamadas de **extremidades adesivas** (**Figura 9-2a**), pois formam pares de bases entre si ou com extremidades adesivas complementares de outros fragmentos de DNA. Outras endonucleases de restrição clivam ambas as fitas do DNA nas ligações fosfodiésteres opostas, sem deixar nenhuma base sem par nas extremidades, frequentemente chamadas de **extremidades cegas** (Figura 9-2b).

O tamanho médio dos fragmentos de DNA produzidos pela clivagem do DNA genômico com uma endonuclease de

**FIGURA 9-1 Ilustração esquemática da clonagem do DNA.** Um vetor de clonagem e cromossomos eucarióticos são clivados separadamente com a mesma endonuclease de restrição (um único cromossomo é mostrado para fins de simplificação). Os fragmentos a serem clonados são então ligados ao vetor de clonagem. O DNA recombinante resultante (apenas um vetor recombinante é mostrado aqui) é introduzido em uma célula hospedeira, onde pode ser propagado (clonado). Observe que este desenho não está em escala: o tamanho do cromossomo de *E. coli* em relação àquele de um típico vetor de clonagem (como um plasmídeo) é muito maior do que o mostrado aqui.

**TABELA 9-2 Sequências de reconhecimento para algumas endonucleases de restrição tipo II**

| Enzima | Sequência | Enzima | Sequência |
|---|---|---|---|
| *Bam*HI | (5′) G G A T C C (3′)<br>C C T A G G | *Hin*dIII | (5′) A A G C T T (3′)<br>T T C G A A |
| *Cla*I | (5′) A T C G A T (3′)<br>T A G C T A | *Not*I | (5′) G C G G C C G C (3′)<br>C G C C G G C G |
| *Eco*RI | (5′) G A A T T C (3′)<br>C T T A A G | *Pst*I | (5′) C T G C A G (3′)<br>G A C G T C |
| *Eco*RV | (5′) G A T A T C (3′)<br>C T A T A G | *Pvu*II | (5′) C A G C T G (3′)<br>G T C G A C |
| *Hae*III | (5′) G G C C (3′)<br>C C G G | *Tth*111I | (5′) G A C N N N G T C (3′)<br>C T G N N N C A G |

Nota: As setas indicam as ligações de fosfodiéster clivadas por cada endonuclease de restrição. Os asteriscos indicam bases metiladas pela metilase correspondente (quando conhecida). N denota qualquer base. Observe que o nome de cada enzima consiste em uma abreviação de três letras (em itálico) da espécie bacteriana da qual ela deriva, por vezes seguida por designação da linhagem e de números romanos para distinguir diferentes endonucleases de restrição isoladas das mesmas espécies bacterianas. Então *Bam*H I é a primeira (I) endonuclease de restrição caracterizada isolada da linhagem H do *B*acyllus *am*yloliquefaciens.

restrição depende da frequência na qual um sítio específico de restrição ocorre na molécula do DNA, que, por sua vez, depende muito do tamanho da sequência de reconhecimento.

Em uma molécula de DNA com sequência aleatória na qual todos os quatro nucleotídeos são igualmente abundantes, uma sequência de 6 pb reconhecida por uma endonuclease de restrição como *Bam*HI pode ocorrer, em média, uma vez a cada $4^6$ (4.096) pb. Enzimas que reconhecem uma sequência de 4 pb produzem fragmentos de DNA menores a partir de uma molécula de DNA com sequência aleatória; uma sequência de reconhecimento desse tamanho ocorreria mais ou menos a cada $4^4$ (256) pb. Em moléculas naturais de DNA, sequências de reconhecimento específicas tendem a ocorrer com menos frequência do que essas, porque as sequências nucleotídicas no DNA não são aleatórias e os quatro nucleotídeos não são igualmente abundantes. Em experimentos laboratoriais, o tamanho médio de fragmentos produzidos pela clivagem por endonucleases de restrição de um DNA grande pode ser aumentado simplesmente terminando a reação antes de se completar o processo; o resultado é chamado de digestão parcial. O tamanho médio do fragmento também pode ser aumentado utilizando-se uma classe especial de endonucleases, chamadas de endonucleases *homing* (ver Figura 26-37). Elas reconhecem e clivam sequências de DNA muito maiores (14 a 20 pb).

Uma vez que a molécula de DNA tenha sido clivada em fragmentos, um determinado fragmento de tamanho conhecido pode ser parcialmente purificado por meio de eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (p. 302) ou por HPLC (p. 92). Para um genoma típico de mamífero, entretanto, a clivagem por endonucleases de restrição geralmente produz um número muito grande de fragmentos de DNA diferentes para permitir o isolamento adequado de um segmento específico. Uma etapa intermediária comum na clonagem de um gene específico ou segmento de DNA é a construção de uma biblioteca de DNA (descrita na Seção 9.2).

Após o isolamento do fragmento de DNA-alvo, a DNA-ligase pode ser utilizada para uni-lo a um vetor de clonagem digerido de modo semelhante –isto é, um vetor digerido pela *mesma* endonuclease de restrição; um fragmento gerado por *Eco*RI, por exemplo, em geral não irá se unir a um fragmento gerado por *Bam*HI. Como descrito mais detalhadamente no Capítulo 25 (ver Figura 25-16), a DNA-ligase catalisa a formação de novas ligações fosfodiésteres em uma reação que utiliza ATP ou um cofator semelhante. O pareamento de bases das extremidades adesivas complementares facilita muito a reação da ligação (Figura 9-2a). As extremidades cegas também podem ser ligadas, embora com menos eficiência. Os pesquisadores podem criar novas sequências de DNA inserindo fragmentos sintéticos de DNA (chamados de ***linkers***) entre as extremidades que estão sendo ligadas. Fragmentos de DNA inseridos com múltiplas sequências de reconhecimento para endonucleases de restrição (frequentemente úteis como pontos para inserção posterior de DNA adicional por clivagem e ligação) são chamados de ***polilinkers*** (Figura 9-2c).

A eficácia das extremidades adesivas em unir seletivamente dois fragmentos de DNA foi revelada nos primeiros experimentos de DNA recombinante. Antes que as endonucleases estivessem amplamente disponíveis, alguns pesquisadores descobriram que podiam gerar extremidades adesivas pela ação combinada da exonuclease do bacteriófago λ e da enzima terminal-transferase (Tabela 9-1). Eram adi-

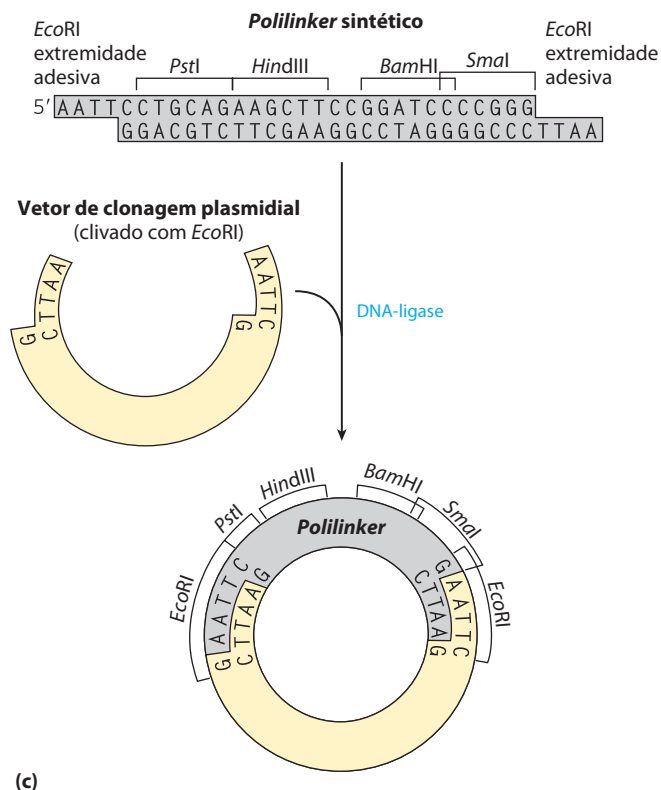
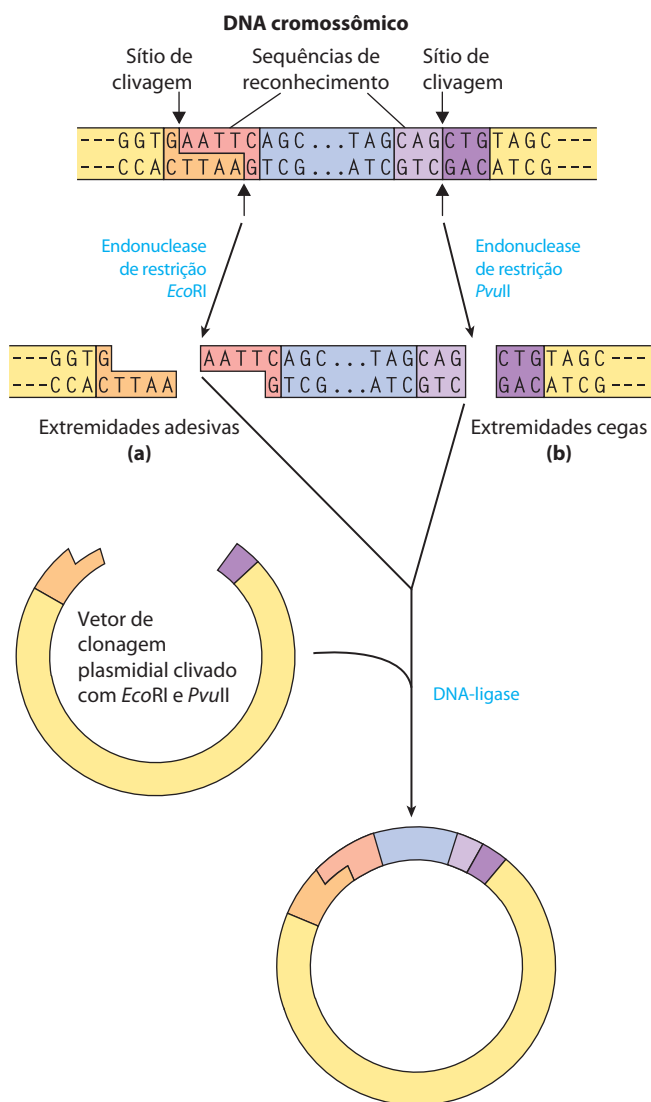



**FIGURA 9-2 Clivagem de moléculas de DNA por endonucleases de restrição.** As endonucleases de restrição reconhecem e clivam apenas sequências específicas, deixando tanto as extremidades adesivas **(a)** (com fitas simples salientes) quanto as extremidades cegas **(b)**. Os fragmentos podem se ligar a outros DNA, como o vetor de clonagem clivado (um plasmídeo) mostrado aqui. Esta reação é facilitada pela renaturação das extremidades adesivas complementares. A ligação é menos eficiente para os fragmentos de DNA com extremidades cegas do que para aqueles com extremidades adesivas complementares, e os fragmentos de DNA com diferentes extremidades adesivas (não complementares) geralmente não se ligam. **(c)** Um fragmento de DNA sintético com sequências de reconhecimento para várias endonucleases de restrição pode ser inserido em um plasmídeo que foi clivado por uma endonuclease de restrição. A inserção é chamada de *linker*; uma inserção com múltiplos sítios de restrição é chamada de *polilinker*. **Endonucleases de restrição**

cionadas caudas homopoliméricas aos fragmentos a serem unidos. Peter Lobban e Dale Kaiser utilizaram esse método em 1971 nos primeiros experimentos para unir fragmentos de DNA de ocorrência natural. Métodos semelhantes foram utilizados logo após no laboratório de Paul Berg para unir segmentos de DNA do vírus de símios 40 (SV40) ao DNA derivado de bacteriófago λ, criando assim a primeira molécula de DNA recombinante com segmentos de DNA de espécies diferentes.

## Os vetores de clonagem permitem a amplificação dos segmentos de DNA inseridos

Os princípios que regem a liberação de DNA recombinante em uma forma clonável a uma célula hospedeira e sua posterior amplificação nessa célula são bem ilustrados considerando-se dois vetores de clonagem comuns – os plasmídeos e os cromossomos artificiais de bactérias – utilizados em experimentos com *E. coli* e um vetor usado para clonar segmentos de DNA grandes em levedura.

**Plasmídeos** Um plasmídeo é uma molécula de DNA circular que se replica separadamente do cromossomo hospedeiro. A grande variedade de plasmídeos bacterianos que ocorre naturalmente varia de tamanho de 5.000 a 400.000 pb. Muitos dos plasmídeos encontrados em populações bacterianas são um pouco mais do que parasitas moleculares, semelhantes aos vírus, mas com capacidade mais limitada de se transferir de uma célula para outra. Para sobreviver na célula hospedeira, os plasmídeos incorporam várias sequências especializadas que os tornam capazes de utilizar a energia das células para sua própria replicação e expressão gênica.

Os plasmídeos de ocorrência natural têm um papel simbiótico na célula: são capazes de fornecer genes que conferem resistência a antibióticos ou que realizam novas funções para a célula. Por exemplo, o plasmídeo Ti de *Agro-*

*bacterium tumefaciens* torna a bactéria hospedeira capaz de colonizar as células de plantas e se utilizar de sua energia. As mesmas propriedades que tornam os plasmídeos capazes de sobreviverem em um hospedeiro bacteriano ou eucariótico são úteis para os biólogos moleculares desenvolverem um vetor para a clonagem de um segmento específico de DNA. O clássico plasmídeo de *E. coli* pBR322, desenvolvido em 1977, é um bom exemplo de um plasmídeo com características úteis em quase todos os vetores de clonagem (**Figura 9-3**):

1. O plasmídeo pBR322 tem uma **origem de replicação**, ou **ori**, uma sequência onde a replicação é iniciada por enzimas celulares (ver Capítulo 25). Essa sequência é necessária para propagar o plasmídeo. Um sistema regulatório associado limita a replicação para manter o pBR322 em um nível de 10 a 20 cópias por célula.
2. O plasmídeo contém genes que conferem resistência aos antibióticos tetraciclina ($Tet^R$) e ampicilina ($Amp^R$), permitindo a seleção de células que contêm o plasmídeo intacto ou uma versão recombinante do plasmídeo (discutida a seguir).
3. Várias sequências de reconhecimento únicas no pBR322 são alvo para endonucleases de restrição (*Pst*I, *Eco*RI, *Bam*HI, *Sal*I e *Pvu*II), fornecendo sítios onde o plasmídeo pode ser cortado e inserido em um DNA exógeno.
4. O pequeno tamanho do plasmídeo (4.361 pb) facilita sua entrada nas células e a manipulação bioquímica do DNA. Esse pequeno tamanho foi gerado simplesmente cortando-se muitos segmentos de DNA a partir de um plasmídeo parental maior – sequências que o biólogo molecular não necessita.

**FIGURA 9-3 O plasmídeo construído de *E. coli* pBR322.** Observe a localização de alguns importantes sítios de restrição – para *Pst*I, *Eco*RI, *Bam*HI, *Sal*I e *Pvu*II; genes com resistência para ampicilina e tetraciclina; e a origem de replicação (ori). Construído em 1977, este foi um dos plasmídeos expressamente projetados para clonagem em *E. coli*.

As origens de replicação inseridas em vetores de plasmídeos comuns foram originalmente derivadas de plasmídeos que ocorrem naturalmente. Como em pBR322, cada uma dessas origens é regulada para manter um número de cópias do plasmídeo específico. Dependendo da origem utilizada, o número de cópias do plasmídeo pode variar de uma a centenas ou milhares por célula, proporcionando muitas opções para os investigadores. Dois plasmídeos diferentes não podem funcionar na mesma célula utilizando a mesma origem de replicação, porque a regulação de um irá interferir com a replicação do outro. Esses plasmídeos são considerados incompatíveis. Quando um pesquisador deseja introduzir dois ou mais plasmídeos diferentes em uma célula bacteriana, cada plasmídeo deve ter uma origem de replicação diferente.

No laboratório, os pequenos plasmídeos podem ser introduzidos em células bacterianas em um processo chamado de **transformação**. As células (frequentemente *E. coli,* mas outras espécies bacterianas também são utilizadas) e o DNA plasmidial são incubados juntos a 0°C em uma solução de cloreto de cálcio e, em seguida, submetidos a choque térmico, alterando rapidamente a temperatura para entre 37°C e 43°C. Por motivos não muito bem compreendidos, algumas das células tratadas desse modo captam o DNA plasmidial. Algumas espécies de bactérias, como o *Acinetobacter baylyi*, são naturalmente competentes na captação do DNA e não necessitam de tratamento com cloreto de cálcio – choque térmico. Em um método alternativo, as células incubadas com o DNA plasmidial são submetidas a um pulso elétrico de alta voltagem. Esse método, chamado de **eletroporação**, torna a membrana bacteriana temporariamente permeável a moléculas grandes.

Independente da abordagem, relativamente poucas células captam o DNA plasmidial, de modo que um método é necessário para identificar aquelas que o fazem. A estratégia é utilizar um dos dois tipos de genes no plasmídeo, chamados de marcadores de seleção e triagem. Os **marcadores de seleção** podem permitir tanto o crescimento de uma célula (seleção positiva) quanto matar a célula (seleção negativa), sob um conjunto definido de condições. O plasmídeo pBR322 fornece exemplos das seleções positiva e negativa (**Figura 9-4**). Um **marcador de triagem** é um gene que codifica uma proteína que leva a célula a produzir uma molécula colorida ou fluorescente. As células não são prejudicadas quando o gene está presente, e as células que transportam o plasmídeo são facilmente identificadas pelas colônias coloridas ou fluorescentes que produzem.

A transformação de células bacterianas normais com DNA purificado (processo pouco eficaz) torna-se menos bem-sucedida com o aumento do tamanho do plasmídeo, sendo difícil clonar segmentos de DNA maiores do que cerca de 15.000 pb, quando os plasmídeos são utilizados como o vetor.

Para ilustrar a utilização de um plasmídeo como vetor de clonagem, considere um gene bacteriano típico, que codifica uma recombinase chamada de proteína RecA (ver Capítulo 25). Na maior parte das bactérias, o gene que codifica RecA é um dos milhares de outros genes em um cromos-

**FIGURA 9-4 Utilização do pBR322 para clonar DNA exógeno em *E. coli* e identificar as células que o contêm.** Clonagem de plasmídeo

somo com milhares de pares de bases de comprimento. O gene *recA* tem um pouco mais de 1.000 pb de comprimento. Um plasmídeo seria uma boa escolha para a clonagem de um gene desse tamanho. Como descrito posteriormente, o gene clonado pode ser modificado de vários modos, e as variantes do gene podem ser expressas em níveis elevados para permitir a purificação da proteína codificada.

**Cromossomos artificiais bacterianos** Projetos de sequenciamento de grandes genomas frequentemente exigem a clonagem de segmentos de DNA mais longos do que normalmente podem ser incorporados em vetores de clonagem plasmidiais padrão, tais como o pBR322. Para atender a essa necessidade, foram desenvolvidos vetores plasmidiais com características especiais que permitem a clonagem de segmentos muito longos (normalmente de 100.000 a 300.000 pb) de DNA. Quando esses grandes segmentos de DNA clonado são adicionados, esses vetores são suficientemente grandes para serem considerados cromossomos e são chamados de **cromossomos artificiais bacterianos**, ou **BAC** (**Figura 9-5**).

Um vetor BAC (sem qualquer DNA clonado inserido) é um plasmídeo relativamente simples, em geral não muito maior do que outros vetores plasmidiais. Para acomodar segmentos de DNA clonado muito longos, os vetores BAC têm origens estáveis de replicação que mantêm o plasmídeo em uma ou duas cópias por célula. O baixo número de cópias é útil para a clonagem de grandes segmentos de DNA porque limita as oportunidades de reações de recombinação indesejadas que podem de modo imprevisto alterar grandes DNAs clonados ao longo do tempo. Os BACs também incluem genes *par* que codificam proteínas, as quais direcionam a distribuição confiável de cromossomos recombinantes para as células-filhas na divisão celular, aumentando assim a probabilidade de cada uma delas transportar uma cópia, mesmo quando algumas cópias estão presentes. O vetor BAC inclui tanto os marcadores de seleção quanto os marcadores de triagem. O vetor BAC mostrado na Figura 9-5 contém um gene que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol ($Cm^R$). A seleção positiva para vetores contendo células ocorre em placas de ágar contendo esse antibiótico. Um gene *lacZ*, necessário para a produção da enzima $\beta$-galactosidase, é um marcador de triagem capaz de revelar as células que contêm os plasmídeos – agora cromossomos – que incorporam os segmentos de DNA clonados. A $\beta$-galactosidase catalisa a conversão da molécula incolor 5-bromo-4-cloro-3-indol-$\beta$-D-galactopiranosídeo (X-gal) a um produto azul. Se o gene intacto for expresso, a colônia que o contém será azul. Se a expressão do gene é interrompida pela introdução de um segmento de DNA clonado, a colônia será branca.

**Cromossomos artificiais de levedura** Assim como no caso de *E. coli*, a genética de leveduras é uma área de conhecimento bem desenvolvida. O genoma de *Saccharomyces cerevisiae* contém apenas $14 \times 10^6$ pb (menos que quatro vezes o tamanho do cromossomo de *E. coli*), e sua sequência inteira é conhecida. A levedura também é muito fácil de ser mantida e cultivada em larga escala em um laboratório. Vetores plasmidiais têm sido construídos para leveduras, empregando os mesmos princípios que se aplicam para o uso de vetores de *E. coli*. Métodos convenientes para mover o

**FIGURA 9-5 Cromossomos artificiais bacterianos (BAC) como vetores de clonagem.** O vetor é um plasmídeo relativamente simples, com uma origem de replicação (ori) que direciona a replicação. Os genes *par*, derivados de um tipo de plasmídeo chamado de plasmídeo F, auxiliam na distribuição dos plasmídeos para as células-filhas, na divisão celular. Isso aumenta a probabilidade de cada célula-filha carregar uma cópia do plasmídeo, mesmo quando poucas cópias estão presentes. O baixo número de cópias é útil na clonagem de grandes segmentos de DNA porque limita as oportunidades para que reações de recombinação indesejadas possam alterar de modo imprevisível grandes DNAs clonados ao longo do tempo. O BAC inclui marcadores de seleção. Um gene *lacZ* (necessário à produção da enzima β-galactosidase) se situa na região de clonagem de tal modo que ele é inativado pelas inserções de DNA clonado. A introdução de BACs recombinantes nas células por eletroporação é promovida pelo de uso de células com uma parede celular alterada (mais porosa). Os DNAs recombinantes são triados para resistência ao antibiótico cloranfenicol ($Cm^R$). As placas também contêm X-gal, um substrato para β-galactosidase que gera um produto azul. As colônias com β-galactosidase ativas e, portanto, nenhum DNA inserido no vetor BAC se tornam azuis; as colônias sem atividade de β-galactosidase e, portanto, com o DNA desejado inserido são brancas.

DNA para dentro e para fora das células de levedura permitem o estudo de muitos aspectos da bioquímica de células eucarióticas. Alguns plasmídeos recombinantes incorporam múltiplas origens de replicação e outros elementos que lhes permitem ser utilizados em mais de uma espécie (p. ex., em leveduras e em *E. coli*). Esses plasmídeos que podem ser propagados em células de duas ou mais espécies são chamados de **vetores *shuttle***.

As pesquisas em grandes genomas e a necessidade associada de vetores de clonagem de alta capacidade levaram ao desenvolvimento de **cromossomos artificiais de levedura** ou **YAC** (**Figura 9-6**). Os vetores YAC contêm todos os elementos necessários para manter um cromossomo eucariótico no núcleo da levedura: uma origem de replicação de levedura, dois marcadores de seleção e sequências especializadas (derivadas de telômeros e do centrômero) necessárias para a estabilidade e a segregação adequadas dos cromossomos na divisão celular (ver Capítulo 24). Na preparação para seu uso na clonagem, o vetor é propagado como um plasmídeo bacteriano circular e, então, isolado e purificado. A clivagem com endonuclease de restrição (*Bam*HI na Figura 9-6) remove um segmento do DNA entre duas sequências de telômeros (TEL), deixando os telômeros nas extremidades do DNA linearizado. A clivagem em outro sítio interno (por *Eco*RI na Figura 9-6) divide o vetor em dois segmentos de DNA, chamados de braços do vetor, cada qual com um marcador de seleção diferente.

O DNA genômico a ser clonado é preparado por digestão parcial com endonucleases de restrição para obter um tamanho de fragmento adequado. Em seguida, os fragmentos genômicos são separados por **eletroforese em gel de campo pulsado**, uma variação da eletroforese em gel (ver Figura 3-18) que separa os segmentos de DNA muito grandes. Os fragmentos de DNA de tamanho adequado (até cerca de $2 \times 10^6$ pb) são misturados com os braços do vetor preparado e ligados. A mistura de ligação é então utilizada para transformar células (pré-tratadas para degradar parcialmente suas paredes celulares) com essas moléculas de DNA muito grandes – que agora têm estrutura e tamanho para serem consideradas cromossomos de levedura. A cultura em um meio que exige a presença de ambos os genes marcadores de seleção assegura o crescimento somente das células de levedura que contêm um cromossomo artificial com grande inserção colocada entre os dois braços do vetor (Figura 9-6). A estabilidade dos clones YAC aumenta com o comprimento do segmento de DNA clonado (até certo ponto). Aqueles contendo inserções com mais de 150.000 pb são quase tão estáveis quanto cromossomos celulares normais, ao passo que os com inserções de menos de 100.000 pb de comprimento são gradativamente perdidos durante a mitose (portanto, em geral não existe nenhum clone de células de levedura carregando apenas as extremidades de dois vetores liga-

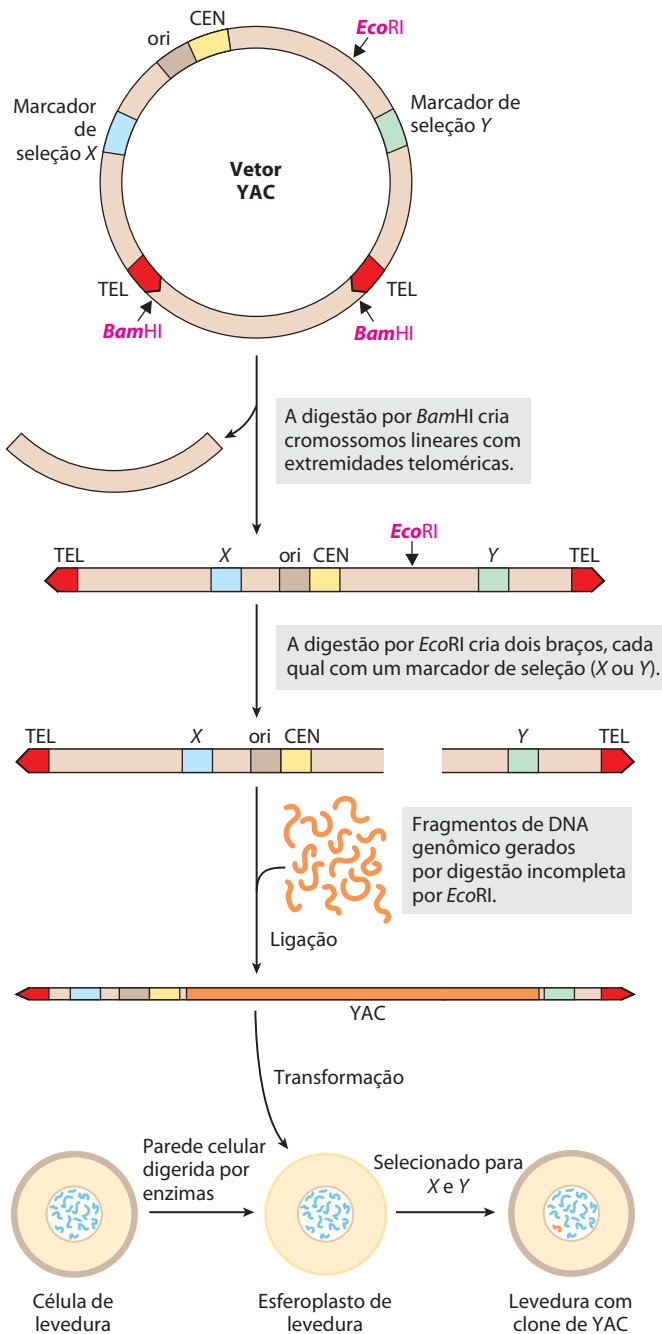



**FIGURA 9-6 Construção de um cromossomo artificial de levedura (YAC).** Um vetor YAC inclui uma origem de replicação (ori), um centrômero (CEN), dois telômeros (TEL) e marcadores de seleção (*X* e *Y*). A digestão por *Bam*HI e *Eco*RI gera dois braços de DNA separados, cada um com uma extremidade telomérica e um marcador de seleção. Um grande segmento de DNA (p. ex., até $2 \times 10^6$ pb de um genoma humano) se liga aos dois braços para criar um cromossomo artificial de levedura. O YAC transforma as células de levedura (preparadas pela remoção da parede celular para formar esferoplastos) e as células são selecionadas para *X* e *Y*; as células sobreviventes propagam as inserções de DNA.

dos juntos ou vetores com apenas inserções curtas). Os YAC sem um telômero em cada uma das extremidades se degradam rapidamente.

Como acontece com os BACs, os vetores YAC podem ser utilizados para clonar segmentos de DNA muito longos. Além disso, o DNA clonado em um YAC pode ser modificado para o estudo de funções de sequências especializadas no metabolismo de cromossomos, mecanismos de regulação e expressão gênica e muitos outros problemas na biologia molecular eucariótica.

## Genes clonados podem ser expressos para amplificar a produção de proteínas

Frequentemente o produto de um gene clonado, mais que o próprio gene, é o interesse principal, sobretudo quando a proteína tem valor comercial, terapêutico ou de pesquisa. Os bioquímicos utilizam proteínas purificadas para muitos fins, incluindo a descoberta do seu funcionamento, o estudo de mecanismos de reação, a geração de anticorpos para as proteínas, a reconstituição de atividades celulares complexas no tubo de ensaio com componentes purificados e o exame de parceiros de ligação de proteínas. Com uma compreensão maior sobre os fundamentos do DNA, do RNA e do metabolismo proteico e sua regulação em um organismo hospedeiro como a *E. coli* ou leveduras, os pesquisadores manipulam células para expressar genes clonados a fim de estudar seus produtos proteicos. O objetivo geral é modificar as sequências ao redor de um gene clonado para enganar o organismo hospedeiro a fim de produzir o produto proteico do gene, frequentemente em níveis muito elevados. A superexpressão de uma proteína torna sua purificação subsequente muito mais fácil.

Como exemplo, será utilizada a expressão de uma proteína eucariótica em uma bactéria. Os genes eucarióticos têm sequências circundantes necessárias para sua transcrição e regulação nas células dos quais são derivados, mas essas sequências não funcionam em bactérias. Assim, os genes eucarióticos não têm os elementos de sequência de DNA necessários para sua expressão controlada em células bacterianas – promotores (sequências que informam à RNA-polimerase onde se ligar para iniciar a síntese de mRNA), sítios de ligação de ribossomos (sequências que permitem a tradução de mRNA para proteína) e sequências regulatórias adicionais. Portanto, as sequências regulatórias bacterianas adequadas para a transcrição e tradução devem ser inseridas no DNA vetor nas posições corretas em relação ao gene eucariótico. Em alguns casos, genes clonados são expressos de maneira tão eficiente que seus produtos proteicos representam 10% ou mais da proteína celular. Nessas concentrações, algumas proteínas estranhas podem matar a célula hospedeira (geralmente *E. coli*); portanto, a expressão do gene clonado deve ser limitada a poucas horas antes da coleta das células.

Vetores de clonagem com sinais de transcrição e tradução necessários à expressão regulada de um gene clonado são chamados de **vetores de expressão**. A taxa de expressão do gene clonado é controlada pela substituição do promotor normal e sequências regulatórias do gene por versões mais eficientes e convenientes fornecidas pelo vetor. Geralmente, um promotor bem caracterizado e seus elementos regulatórios são posicionados próximos a vários sítios de restrição exclusivos para a clonagem, de modo que

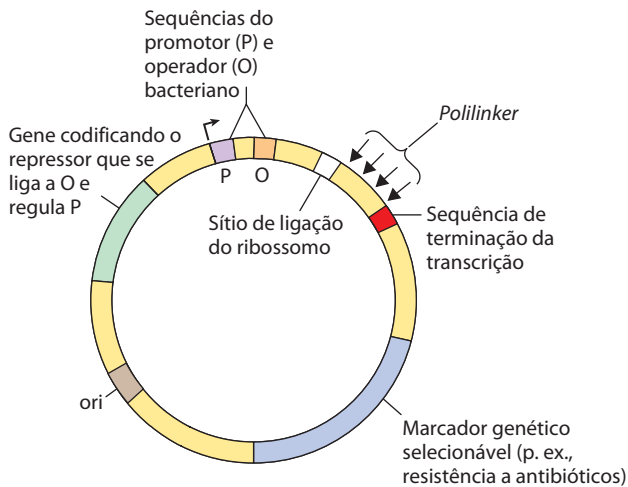



**FIGURA 9-7 Sequências de DNA em um típico vetor de expressão de *E. coli*.** O gene a ser expresso é inserido em um dos sítios de restrição no *polilinker*, perto do promotor (P), com a extremidade do gene codificando a terminação amina da proteína posicionada o mais perto possível do promotor. O promotor permite a transcrição eficiente do gene inserido, e a sequência de transcrição-terminação algumas vezes aumenta a quantidade e a estabilidade do mRNA produzido. O operador (O) permite a regulação por um repressor que se liga a ele. O sítio de ligação do ribossomo fornece sinais de sequências para a tradução eficiente do mRNA derivado do gene. O marcador selecionado permite a seleção de células contendo o DNA recombinante.

genes inseridos nos sítios de restrição sejam expressos a partir desses elementos do promotor regulado (**Figura 9-7**). Alguns desses vetores incorporam outras características, tais como um sítio de ligação de ribossomos bacterianos, para potencializar a tradução do mRNA derivado do gene (Capítulo 27) ou uma sequência de terminação da transcrição (Capítulo 26).

## Muitos sistemas diferentes são utilizados para expressar proteínas recombinantes

Todo organismo vivo tem a capacidade de expressar genes em seu DNA genômico; portanto, em princípio, qualquer organismo pode ser um hospedeiro para expressar proteínas de espécies diferentes (heterólogas). De fato, quase todos os tipos de organismos são utilizados para esse fim, e cada tipo de hospedeiro tem um conjunto próprio de vantagens e desvantagens.

**Bactérias** As bactérias, especialmente *E. coli*, são os hospedeiros mais comuns para a expressão de proteínas. As sequências regulatórias que determinam a expressão gênica em *E. coli* e em muitas outras bactérias são bem compreendidas e podem ser aproveitadas para expressar proteínas clonadas em níveis elevados. As bactérias são fáceis de armazenar e cultivar em laboratório, em meios de cultivo baratos. Também existem métodos eficientes para colocar DNA em bactérias e extrair o DNA delas. As bactérias podem ser cultivadas em grandes quantidades em fermentadores comerciais, fornecendo uma rica fonte de proteínas clonadas. Entretanto, existem problemas. Quando expressas em bactérias, algumas proteínas heterólogas não se dobram corretamente, e muitas não fazem as ligações covalentes ou a clivagem proteolítica necessárias à sua atividade. Devido a certas características de uma sequência gênica, dificilmente um gene específico também se expressa em bactérias. Por exemplo, regiões intrinsecamente desordenadas são mais comuns em proteínas eucarióticas. Expressas em bactérias, muitas proteínas eucarióticas se agregam em precipitados celulares insolúveis chamados de corpos de inclusão. Por essas e muitas outras razões, algumas proteínas eucarióticas são inativas quando purificadas de bactérias ou não se expressam de modo algum. Para ajudar a lidar com alguns desses problemas, novas linhagens bacterianas hospedeiras são regularmente desenvolvidas para incluir melhorias, como a presença de chaperonas proteicas eucarióticas ou enzimas que modifiquem as proteínas eucarióticas.

Há muitos sistemas especializados para expressar proteínas em bactérias. O promotor e as sequências regulatórias associadas ao óperon lactose (ver Capítulo 28) são com frequência fusionados ao gene de interesse para direcionar a transcrição. O gene clonado será transcrito quando a lactose for adicionada ao meio de cultivo. Entretanto, a regulação no sistema lactose é "frouxa"; ela não é desligada completamente quando a lactose está ausente – problema potencial se o produto do gene clonado for tóxico para as células hospedeiras. A transcrição a partir do promotor Lac também não é muito eficiente para algumas aplicações.

Um sistema alternativo utiliza um promotor e a RNA-polimerase encontrada em um vírus bacteriano chamado de bacteriófago T7. Se o gene clonado for fusionado a um promotor T7, ele não será transcrito pela RNA-polimerase de *E. coli*, mas pela RNA-polimerase T7. O gene que codifica essa polimerase é clonado separadamente na mesma célula em uma construção que proporciona uma regulação rigorosa (permitindo a produção controlada da RNA-polimerase

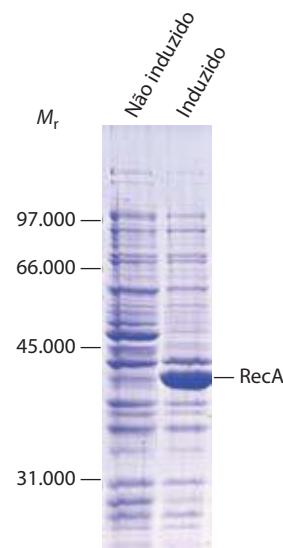



**FIGURA 9-8 Expressão regulada da proteína RecA em uma célula bacteriana.** O gene que codifica a proteína RecA, fusionado com o promotor T7 do bacteriófago, é clonado em um vetor de expressão. Em condições normais de crescimento (não induzido), nenhuma proteína RecA aparece. Quando a RNA-polimerase de T7 é induzida na célula, o gene *recA* é expresso e grandes quantidades da proteína RecA são produzidas. As posições dos marcadores de peso molecular padrão que correm no mesmo gel são indicadas.

T7). A polimerase também é muito eficiente e direciona níveis elevados de expressão da maioria dos genes fusionados no promotor T7. Esse sistema é utilizado para expressar a proteína RecA em células bacterianas (**Figura 9-8**).

**Leveduras** A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é provavelmente o organismo eucariótico mais bem compreendido e um dos mais fáceis de cultivar e manipular em laboratório. Como as bactérias, essa levedura pode crescer em meios simples e baratos. A levedura tem paredes celulares resistentes, que são difíceis de romper para introduzir vetores de DNA; assim, as bactérias são mais convenientes para fazer a maior parte da engenharia genética e manutenção de vetores. É por isso que o vetor de leveduras foi propagado pela primeira vez em bactérias. Existem vários excelentes vetores de transporte para esse fim.

Os princípios subjacentes à expressão de uma proteína em leveduras são os mesmos daqueles em bactérias. Os genes clonados devem ser ligados aos promotores que podem direcionar a expressão de alto nível em leveduras. Por exemplo, os genes da levedura *GAL1* e *GAL10* são regulados pela célula de modo a serem expressos quando as células da levedura são cultivadas em meios com galactose, mas desligados quando as células são cultivadas em glicose. Assim, se um gene heterólogo é expresso utilizando as mesmas sequências reguladoras, a expressão desse gene pode ser controlada simplesmente pela escolha de um meio adequado para o crescimento celular.

Alguns dos mesmos problemas que acompanham a expressão de proteínas em bactérias também ocorrem em leveduras. Proteínas heterólogas podem não se dobrar corretamente, a levedura talvez não tenha as enzimas necessárias para modificar as proteínas em suas formas ativas, ou a expressão de proteínas pode ser dificultada por algumas características da sequência gênica. Entretanto, como o *S. cerevisiae* é um eucarioto, a expressão de genes eucarióticos (especialmente os genes de leveduras) é algumas vezes mais eficiente nesse hospedeiro do que em bactérias. O enovelamento e a modificação dos produtos também podem ser mais precisos do que nas proteínas expressas em bactérias.

**Insetos e vírus de insetos** Os baculovírus são vírus de insetos com genomas de DNA de cadeia dupla. Ao infectarem larvas de insetos hospedeiras, agem como parasitas, matando as larvas e transformando-as em fábricas de produção de vírus. No final do processo de infecção, os vírus produzem grandes quantidades de duas proteínas (p10 e poliedrina), nenhuma das quais é necessária para a produção do vírus em células de inseto cultivadas. Os genes para ambas as proteínas podem ser substituídos pelo gene de uma proteína heteróloga. Quando o vírus recombinante resultante é utilizado para infectar células ou larvas de insetos, a proteína heteróloga é frequentemente produzida em níveis muito elevados – até 25% do total de proteínas presentes no final do ciclo de infecção.

O nucleopoliedrovírus multicapsídeo *Autographa californica* (AcMNPV) é o **baculovírus** mais utilizado para a expressão de proteínas. Ele tem um genoma grande demais (134.000 pb) para a clonagem direta. A purificação de vírus também é complicada. Esses problemas foram resolvidos com a criação de **bacmídeos**, DNA circulares grandes que incluem todo o genoma do baculovírus, além das sequências que permitem a replicação do bacmídeo em *E. coli* (**Figura 9-9**). O gene de interesse é clonado em um plasmídeo menor e combinado com o plasmídeo maior por recombinação sítio-específica *in vivo* (ver Figura 25-37). O bacmídeo recombinante é então isolado e transfectado para as células de insetos (o termo **transfecção** é utilizado quando o DNA utilizado para a transformação inclui sequências virais e leva à replicação viral), seguido por uma recuperação da proteína assim que termina o ciclo de infecção. Uma grande variedade de sistemas de bacmídeos está disponível comercialmente. Os sistemas de baculovírus não são bem-sucedidos com todas as proteínas. Entretanto, com esses sistemas, as células de insetos algumas vezes replicam com sucesso os padrões de modificação de proteína de eucariotos superiores e produzem proteínas eucarióticas ativas corretamente modificadas.

**Células de mamíferos em cultura** O modo mais conveniente para se introduzir genes clonados em uma célula de mamífero é por meio de vírus. Esse método tem a vantagem de utilizar a capacidade natural de um vírus para inserir seu DNA ou RNA em uma célula e, por vezes, no cromossomo celular. Diversos vírus de mamíferos geneticamente modificados estão disponíveis como vetores, incluindo o adenovírus e retrovírus humanos. O gene de interesse é clonado, de modo que a sua expressão seja controlada por um promotor do vírus. O vírus utiliza seus mecanismos de infecção naturais para introduzir o genoma recombinante nas células, onde se expressa a proteína clonada. Esses sistemas têm a vantagem de as proteínas serem expressas transitoriamente (se o DNA viral for mantido separadamente a partir do genoma da célula hospedeira e, por fim, degradado) ou permanentemente (se o DNA viral for integrado no genoma da célula hospedeira). Com a escolha correta da célula hospedeira, a modificação pós-tradução adequada da proteína para sua forma ativa pode ser assegurada. Entretanto, o crescimento de células de mamíferos em culturas de tecidos é muito caro, e essa tecnologia é geralmente utilizada para testar a função de uma proteína *in vivo*, em vez de produzir uma proteína em grandes quantidades.

## A alteração de genes clonados produz proteínas alteradas

Técnicas de clonagem podem ser utilizadas não só para produzir mais proteínas, mas para produzir produtos proteicos alterados, sutilmente ou de forma drástica, a partir de suas formas nativas. Aminoácidos específicos podem ser substituídos individualmente por **mutagênese sítio-direcionada**. Essa técnica melhorou substancialmente as pesquisas sobre proteínas, ao permitir que os investigadores façam alterações específicas na estrutura primária e analisem os efeitos dessas alterações no enovelamento, na estrutura tridimensional e na atividade de proteínas. Essa abordagem poderosa para estudar a estrutura e função das proteínas muda a sequência de aminoácidos pela alteração da sequência de DNA do gene clonado. Se os sítios de restrição adequados se situam ao lado da sequência a ser alterada, os pesquisadores podem simplesmente remover um segmento de DNA e substituí-lo por um sintético idêntico ao original, exceto para a mudança desejada (**Figura 9-10a**).

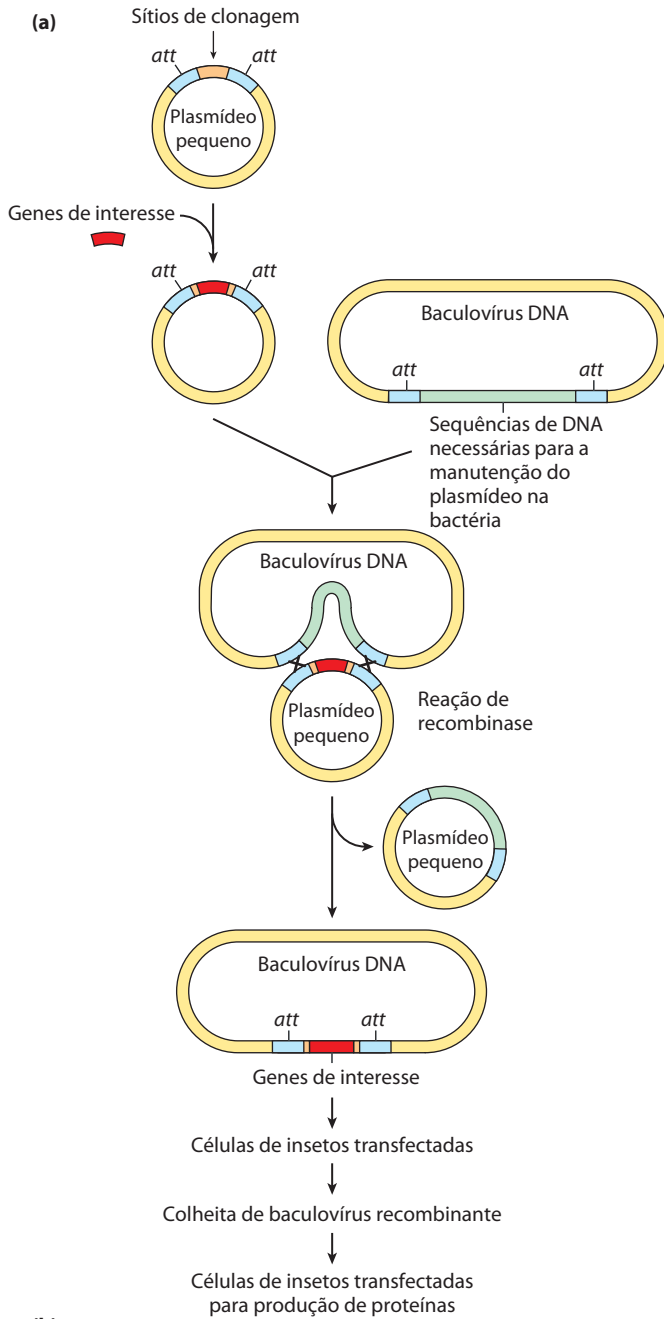



**FIGURA 9-9 Clonagem com baculovírus.** **(a)** Aqui é mostrada a construção de um vetor típico utilizado para a expressão de proteínas em baculovírus. O gene de interesse é clonado em um plasmídeo pequeno (esquerda) entre dois sítios (*att*) reconhecidos pela recombinase sítio-específica, sendo em seguida introduzido no vetor do baculovírus por recombinação sítio-específica (ver Figura 25-37). Isso gera um produto de DNA circular utilizado para infectar as células de uma larva de inseto. O gene de interesse é expresso durante o ciclo de infecção, abaixo de um promotor que normalmente expressa uma proteína de revestimento de baculovírus em níveis muito elevados. **(b)** As fotografias mostram (à esquerda) uma larva de inseto infectada com o vetor do baculovírus recombinante expressando uma proteína que produz cor vermelha e (à direita) uma larva não infectada.

Na ausência de sítios de restrição adequadamente localizados, a **mutagênese oligonucleotídeo-direcionada** pode criar uma alteração específica na sequência de DNA (Figura 9-10b). Duas cadeias de DNA curtas, sintetizadas de modo complementar, cada uma com a alteração de base desejada, são renaturadas em cadeias opostas do gene clonado dentro de um vetor de DNA circular adequado. O malpareamento de um único par de bases em 30 a 40 pb não impede a renaturação. Os dois oligonucleotídeos renaturados sintetizam o primeiro DNA em ambas as direções ao redor do vetor de plasmídeo, criando duas fitas complementares que contêm a mutação. Após vários ciclos de amplificação seletiva, utilizando uma técnica chamada de reação em cadeia da polimerase (PCR; descrita na p. 327), a mutação contendo o DNA predomina na população e pode ser utilizada para transformar bactérias. A maior parte das bactérias transformadas terá plasmídeos portadores da mutação. Se necessário, o molde do DNA do plasmídeo não mutante pode ser seletivamente eliminado por clivagem com a enzima de restrição *DpnI*. O plasmídeo-molde, geralmente isolado a partir de um tipo selvagem de *E. coli*, tem um resíduo A metilado em cada cópia do palíndromo de quatro nucleótidos, GATC (chamado de sítio dam; ver Figura 25-21). O novo DNA contendo a mutação não tem resíduos A metilados porque a replicação é realizada *in vitro*. A *DpnI* cliva seletivamente o DNA na sequência GATC apenas se o resíduo A de uma ou ambas as cadeias for metilado, isto é, ela degrada apenas o molde.

No caso do gene *rec*A bacteriano, o produto desse gene, a proteína RecA, tem várias atividades (ver Seção 25.3). Ela liga e forma uma estrutura filamentosa no DNA, alinha dois DNAs de sequências semelhantes e hidrolisa o ATP. Um resíduo de aminoácido especial na RecA (polipeptídeo de 352 resíduos), o resíduo Lys na posição 72, está envolvido na hidrólise do ATP. Alterando o $Lys^{72}$ para uma Arg, uma variante da proteína RecA é criada e irá ligar, mas não hidrolisar o ATP (Figura 9-10c). A engenharia e a purificação dessa proteína variante RecA tem facilitado a investigação sobre os papéis da hidrólise do ATP no funcionamento dessa proteína.

Em genes podem ser introduzidas alterações que envolvem mais de um par de bases. Grandes partes de um gene podem ser excluídas cortando-se um segmento com endonucleases de restrição e ligando as porções remanescentes para formar um gene menor. Por exemplo, se uma proteína tiver dois domínios, o segmento do gene que codifica um dos domínios pode ser removido para produzir uma proteína que agora tem apenas um dos dois originais.

**FIGURA 9-10 Duas abordagens para a mutagênese sítio-direcionada. (a)** Um segmento sintético de DNA substitui um fragmento removido por uma endonuclease de restrição. **(b)** Um par de oligonucleotídeos sintéticos e complementares com uma mudança de sequência específica em uma posição é hibridizado a um plasmídeo circular com uma cópia clonada do gene que será alterado. Os oligonucleotídeos mutados atuam como iniciadores para a síntese de todo o comprimento da cópia de DNA duplex do plasmídeo que contém a mudança de sequência específica. Essas cópias de plasmídeos são então utilizadas para transformar as células. **(c)** Resultados de um sequenciador automatizado (ver Figura 8-34), mostrando as sequências de um tipo selvagem de gene *recA* (superior), e um gene *recA* alterado (inferior) com o triplo (códon) na posição 72 alterado de AAA para CGC, especificando um Arg (R) em vez de um resíduo Lys (K).

Partes dos dois genes diferentes podem ser ligadas para criar novas combinações; o produto desse gene fusionado é chamado de **proteína de fusão**. Pesquisadores têm métodos engenhosos para realizar praticamente qualquer alteração genética *in vitro*. Após a reintrodução do DNA alterado na célula, eles investigam as consequências dessa alteração.

## Marcadores terminais fornecem instrumentos para a purificação por afinidade

A cromatografia de afinidade é um dos métodos mais eficientes para a purificação de proteínas (ver Figura 3-17c). Infelizmente, muitas proteínas não se ligam a um ligante que possa ser convenientemente imobilizado em uma matriz de coluna. Entretanto, o gene para quase todas as proteínas pode ser alterado para expressar uma proteína de fusão purificada por cromatografia de afinidade. O gene que codifica a proteína-alvo é fusionado com um gene que codifica um peptídeo ou proteína que se liga a um ligante simples e estável, com elevada afinidade e especificidade. O peptídeo ou proteína utilizado para essa finalidade é denominado **marcador**. As sequências dos marcadores são adicionadas a genes de tal modo que as proteínas resultantes tenham marcadores em seu grupo amino ou carboxila terminal. A Tabela 9-3 lista alguns dos peptídeos ou proteínas comumente utilizados como marcadores.

**TABELA 9-3** Caudas proteicas comumente usadas

| Marcadores proteicos/peptídicos | Massa molecular (kDa) | Ligante imobilizado |
|---|---|---|
| Proteína A | 59 | Porção Fc da IgG |
| $(His)_6$ | 0,8 | $Ni^{2+}$ |
| Glutationa-*S*-transferase (GST) | 26 | Glutationa |
| Proteína ligante de maltose | 41 | Maltose |
| $\beta$-Galactosidase | 116 | *p*-Aminofenil-$\beta$-D-tiogalactosídeo (TPEG) |
| Domínio ligante de quitina | 5,7 | Quitina |

**FIGURA 9-11 Utilização de proteínas marcadas na purificação de proteínas.** **(a)** A glutationa-*S*-transferase (GST) é uma pequena enzima que liga a glutationa (resíduo de glutamato no qual um dipeptídeo Cys-Gly se liga ao carbono da carboxila da cadeia lateral de Glu, daí sua abreviação GSH). **(b)** O marcador de GST se fusiona ao terminal carboxila da proteína por meio de engenharia genética. A proteína marcada expressa na célula está presente no extrato bruto quando as células são lisadas. O extrato é submetido à cromatografia de afinidade (ver Figura 3-17c) por uma matriz com glutationa imobilizada. A proteína marcada com GST se liga à glutationa, retardando sua migração pela coluna, enquanto as outras proteínas são lavadas rapidamente. Depois a proteína marcada é eluída com uma solução contendo uma concentração elevada de sal ou livre de glutationa.

O procedimento geral pode ser ilustrado focalizando um sistema que utiliza a glutationa-S-transferase (GST) (**Figura 9-11**). A GST é uma pequena enzima ($M_r$ 26.000) que se liga fortemente e de modo específico à glutationa. Quando a sequência do gene de GST é fusionada ao gene-alvo, a proteína de fusão adquire a capacidade de se ligar à glutationa. A proteína de fusão é expressa em um organismo hospedeiro, tal como uma bactéria, e um extrato bruto é preparado. Uma coluna é preenchida com matriz porosa, que consiste em um ligante (glutationa) imobilizado por esferas microscópicas de um polímero reticulado estável, como a agarose. À medida que o extrato bruto se infiltra por essa matriz, a proteína de fusão é imobilizada por sua ligação à glutationa. As outras proteínas no extrato são lavadas e descartadas da coluna. A interação entre GST e glutationa é firme, porém não covalente, permitindo que a proteína de fusão seja eluída suavemente da coluna com uma solução que contém alta concentração de sais ou de glutationa livre para competir com o ligante imobilizado pela ligação com a GST. A proteína de fusão é obtida muitas vezes com boa produção e alta pureza. Em alguns sistemas disponíveis comercialmente, o marcador pode ser removido em grande parte ou totalmente da proteína de fusão purificada por uma protease que cliva uma sequência próxima da junção entre a proteína-alvo e seu marcador.

Um marcador mais curto, com ampla aplicação, consiste em uma sequência simples de seis ou mais resíduos His. Esses marcadores de histidina, ou marcadores His, se ligam de

modo firme e especificamente, aos íons de níquel. A matriz da cromatografia com íons de $Ni^{2+}$ imobilizados pode ser utilizada para separar rapidamente uma proteína marcada com His de outras proteínas no extrato. Alguns dos marcadores maiores, como a proteína de ligação de maltose, proporcionam estabilidade e solubilidade adicionais, permitindo a purificação de proteínas clonadas que, de outro modo, seriam inativas em consequência de um enovelamento inadequado ou insolubilidade.

A cromatografia de afinidade utilizando marcadores terminais é um método poderoso e conveniente. Os marcadores têm sido utilizados com sucesso em milhares de estudos publicados; em muitos casos, seria impossível purificar e estudar a proteína sem o marcador. Entretanto, mesmo os marcadores muito pequenos afetam as propriedades das proteínas ligadas a eles, de modo a influenciar os resultados do estudo. Por exemplo, um marcador pode afetar adversamente o enovelamento de proteínas. Mesmo se o marcador for removido por uma protease, um ou alguns resíduos de aminoácidos adicionais ficam por trás da proteína-alvo, afetando ou não a atividade da proteína. Os tipos de experimentos a serem realizados, e os resultados obtidos a partir deles, devem ser sempre avaliados com o auxílio de controles bem desenhados para avaliar o efeito de um marcador no funcionamento de uma proteína.

## As sequências gênicas podem ser amplificadas com a reação em cadeia da polimerase

Os projetos do genoma mundial geram bancos de dados internacionais que contêm as sequências genômicas completas de centenas de organismos e proporcionam um acesso sem precedentes à informação da sequência gênica. Essa, por sua vez, simplifica o processo de clonagem de genes individuais para análises mais detalhadas. Se a sequência de, pelo menos, porções da extremidade de um segmento de DNA de interesse é conhecida, o número de cópias do segmento de DNA pode ser muito amplificado com a **reação em cadeia da polimerase** (**PCR**), processo concebido por Kary Mullis em 1983. O DNA amplificado pode então ser clonado por métodos descritos anteriormente ou pode ser utilizado em vários procedimentos analíticos.

O procedimento de PCR tem uma simplicidade elegante. Baseia-se em DNA-polimerases que sintetizam fitas de DNA a partir de desoxirribonucleotídeos, utilizando um molde de DNA (Capítulo 25). Todas as DNA-polimerases sintetizam DNA na direção $5' \rightarrow 3'$ (ver Figura 8-33a). Além disso, as DNA-polimerases não sintetizam DNA novo, mas, ao contrário, devem adicionar nucleotídeos a fitas preexistentes, denominadas oligonucleotídeos iniciadores (*primers*). Dois oligonucleotídeos sintéticos são preparados, complementares às sequências em fitas opostas ao DNA-alvo, em posições que definem as extremidades do segmento a ser amplificado. Os oligonucleotídeos servem como iniciadores de replicação que podem ser estendidos por uma DNA-polimerase. As extremidades 3′ dos iniciadores hibridizados são orientadas uma para a outra e posicionadas para a síntese do DNA pelo segmento de DNA (**Figura 9-12a**). A PCR básica necessita de quatro componentes: uma amostra de DNA contendo o segmento a ser amplificado, o par de oligonucleotídeos iniciadores sintéticos, desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) e DNA-polimerase. A mistura de reação é aquecida brevemente para desnaturar o DNA, separando as duas fitas. A mistura é resfriada de modo a que os oligonucleotídeos iniciadores possam renaturar com o DNA. A concentração elevada de oligonucleotídeos iniciadores aumenta a probabilidade de renaturação com cada fita do DNA desnaturado antes que as duas fitas de DNA (presentes em concentração muito menor) possam renaturar entre si. O segmento é, em seguida, replicado seletivamente pela DNA-polimerase, utilizando o conjunto de dNTPs. O ciclo de aquecimento, resfriamento e replicação é repetido 25 a 30 vezes em algumas horas, em um processo automatizado, amplificando o segmento de DNA entre os oligonucleotídeos iniciadores, até que ele possa ser rapidamente analisado ou clonado. Cada ciclo multiplica a quantidade de segmento de DNA por um fator de 2, de modo que a concentração do DNA cresça exponencialmente. Após 20 ciclos, o segmento de DNA foi amplificado mais de um milhão de vezes ($2^{20}$); após 30 ciclos, mais de um bilhão de vezes. Todo o DNA restante na amostra permanece sem amplificação. A PCR utiliza uma DNA-polimerase termoestável, que se mantém ativa após cada etapa de aquecimento e não precisa ser reabastecida.

Por meio de um desenho cuidadoso dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a PCR, o segmento amplificado pode ser modificado pela inclusão, em cada extremidade, de DNA adicional que não está presente no cromossomo-alvo. Por exemplo, sítios de clivagem para endonucleases de restrição podem ser incluídos para facilitar a posterior clonagem do DNA amplificado (Figura 9-12b).

Essa tecnologia é muito sensível: a PCR pode detectar e amplificar tão pouco quanto uma molécula de DNA em quase todo tipo de amostra. A estrutura em dupla-hélice do DNA torna a molécula altamente estável e, de fato, o DNA se degrada lentamente ao longo do tempo (ver Capítulo 8). Entretanto, a PCR permitiu a clonagem bem-sucedida de segmentos de DNA raros e não degradados de amostras de mais de 40.000 anos. Os pesquisadores utilizaram a técnica para clonar fragmentos de DNA dos restos mumificados de seres humanos e animais extintos, como o mamute, criando os novos campos da arqueologia e paleontologia molecular. O DNA de locais de sepultamento foi amplificado por PCR e utilizado para rastrear migrações de humanos antigos. Epidemiologistas podem utilizar amostras de DNA de remanescentes humanos potencializadas por PCR para rastrear a evolução de vírus patogênicos humanos. Assim, além da sua utilidade para a clonagem de DNA, a PCR é uma ferramenta poderosa na medicina forense (Quadro 9-1). Ela pode ser utilizada para detectar infecções virais antes que provoquem sintomas. A PCR é uma ferramenta importante para o aconselhamento genético de potenciais pais de família com condições genéticas hereditárias importantes.

Dada a extrema sensibilidade dos métodos de PCR, a contaminação de amostras se constitui em um sério problema. Em muitas aplicações, incluindo os testes de DNA forense e de arqueologia, as amostras controle asseguram que o DNA amplificado não seja derivado do pesquisador ou de bactérias contaminantes.

Muitas adaptações especializadas de PCR aumentaram a utilidade do método. Por exemplo, as sequências no RNA podem ser amplificadas se o primeiro ciclo de PCR utilizar

(a)

Região do DNA-alvo que será amplificada

3′
5′

❶ Aquecimento para separar as fitas.

❷ Adição de oligonucleotídeos iniciadores sintéticos; resfriamento.

3′
5′
5′
5′

❸ Adição de *Taq* DNA-polimerase termoestável para catalisar a síntese do DNA 5′→3′.

3′
5′
5′
5′

Repetição das etapas ❶ e ❷.

3′
5′

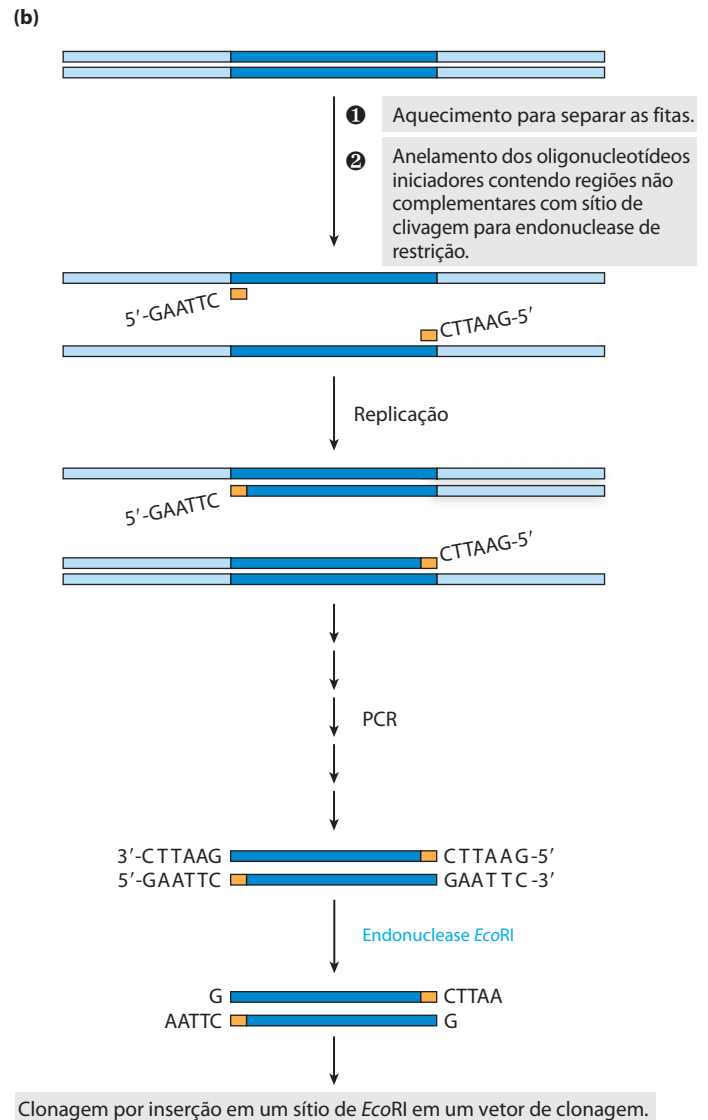
A síntese do DNA (etapa ❸) é catalisada pela DNA-polimerase termoestável (ainda presente).

3′
5′

Repetição das etapas de ❶ até ❸.

3′
5′

Após 20 ciclos, a sequência-alvo foi amplificada em cerca de $10^6$ vezes.

**FIGURA 9-12 Amplificação de um segmento de DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR). (a)** O procedimento de PCR tem três etapas. As fitas de DNA são ❶ separadas pelo calor, em seguida ❷ renaturadas em um excesso de iniciadores de DNA sintético curto (cor de laranja) que ficam ao lado da região que será amplificada (azul-escuro); ❸ um DNA novo é sintetizado pela polimerização catalisada pela DNA-polimerase. As três etapas se repetem por 25 a 30 ciclos. A *Taq* DNA-polimerase termoestável (de *Thermus aquaticus*, espécie de bactéria que cresce em fontes termais) não é desnaturada pelas etapas de calor. **(b)** O DNA amplificado por PCR pode ser clonado. Os oligonucleotídeos iniciadores podem incluir extremidades não complementares que tenham um sítio para clivagem por uma endonuclease de restrição. Embora essas partes dos oligonucleotídeos iniciadores não se anelem ao DNA-alvo, o processo de PCR os incorpora no DNA que é amplificado. A clivagem dos fragmentos amplificados nesses sítios cria as extremidades adesivas, utilizadas na ligação do DNA amplificado com o vetor de clonagem. **Reação em cadeia da polimerase.**

## QUADRO 9-1 MÉTODOS Poderosa ferramenta na medicina legal

Um dos métodos mais precisos para a colocação de um indivíduo na cena de um crime é a impressão digital. O advento da tecnologia do DNA recombinante disponibilizou uma ferramenta muito mais poderosa: a **genotipagem de DNA** (também chamada de DNA *fingerprinting* ou perfis de DNA). O método se baseia nos polimorfismos da sequência – diferenças sutis na sequência entre os indivíduos: um em cada 1.000 pb, em média. O uso dessas diferenças para identificação forense foi descrito pela primeira vez pelo geneticista inglês Alec Jeffreys em 1985. Cada diferença em relação ao protótipo de sequência do genoma humano (o primeiro obtido) ocorre em alguma fração na população humana; cada pessoa tem algumas diferenças em relação a esse protótipo.

O trabalho forense moderno concentra-se em diferenças nos comprimentos das sequências **repetições curtas em tandem** (**STR**). A STR é uma sequência de DNA curta, repetida muitas vezes em tandem em um local específico em um cromossomo; geralmente, a sequência repetida tem 4 pb de comprimento. Os *loci* STR mais frequentemente utilizados na genotipagem de DNA são curtos – 4 a 50 repetições de comprimento (16 a 200 pb para repetições de tetranucleotídeos) – e têm múltiplas variantes de comprimento na população humana. Mais de 20.000 *loci* STR de tetranucleotídeos foram caracterizados e mais de um milhão de STR de todos os tipos podem estar presentes no genoma humano, o que representa cerca de 3% de todo o DNA humano.

*(Continua na próxima página)*

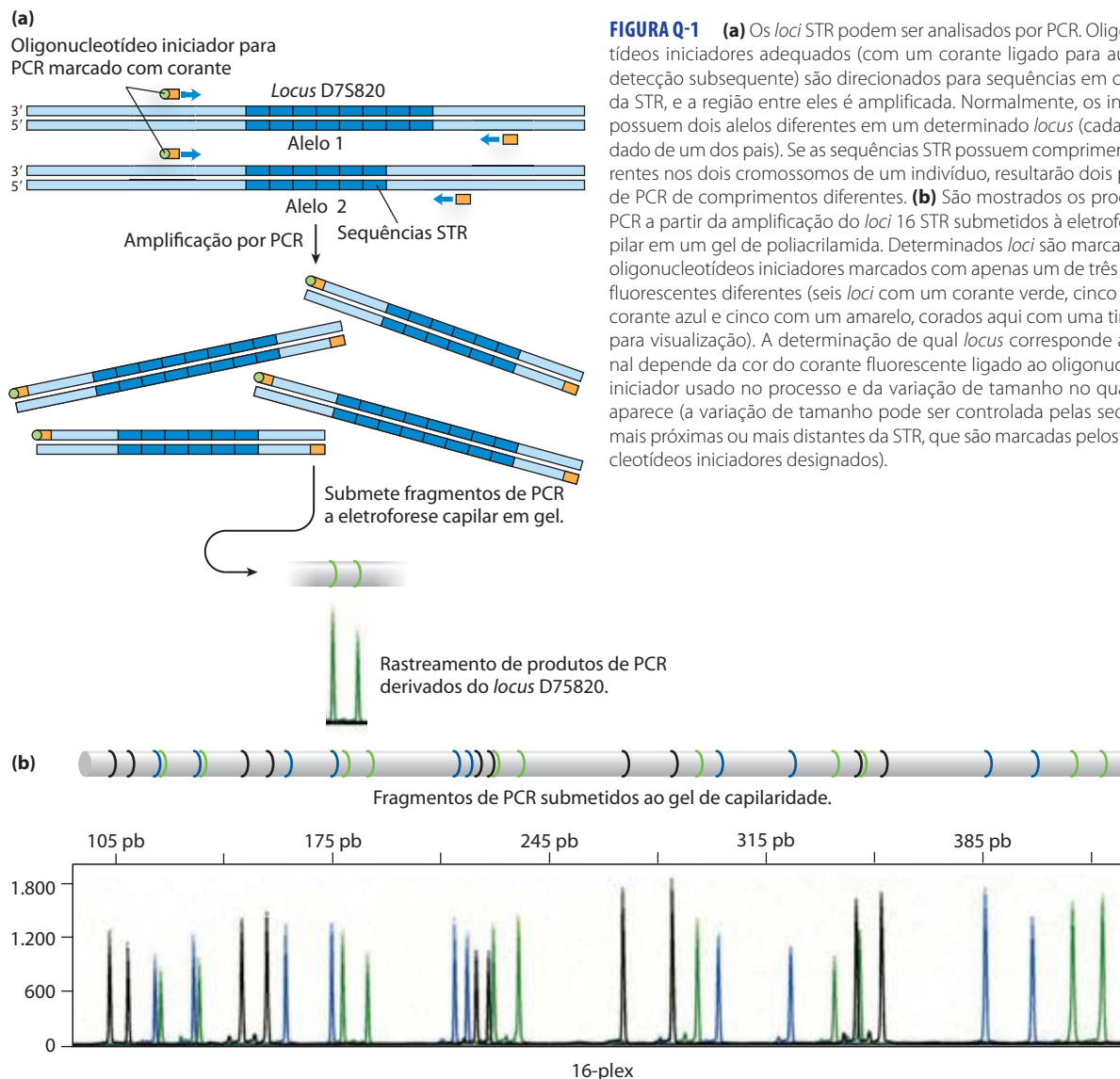



**FIGURA Q-1** **(a)** Os *loci* STR podem ser analisados por PCR. Oligonucleotídeos iniciadores adequados (com um corante ligado para auxiliar na detecção subsequente) são direcionados para sequências em cada lado da STR, e a região entre eles é amplificada. Normalmente, os indivíduos possuem dois alelos diferentes em um determinado *locus* (cada um herdado de um dos pais). Se as sequências STR possuem comprimentos diferentes nos dois cromossomos de um indivíduo, resultarão dois produtos de PCR de comprimentos diferentes. **(b)** São mostrados os produtos de PCR a partir da amplificação do *loci* 16 STR submetidos à eletroforese capilar em um gel de poliacrilamida. Determinados *loci* são marcados com oligonucleotídeos iniciadores marcados com apenas um de três corantes fluorescentes diferentes (seis *loci* com um corante verde, cinco com um corante azul e cinco com um amarelo, corados aqui com uma tinta preta para visualização). A determinação de qual *locus* corresponde a qual sinal depende da cor do corante fluorescente ligado ao oligonucleotídeo iniciador usado no processo e da variação de tamanho no qual o sinal aparece (a variação de tamanho pode ser controlada pelas sequências, mais próximas ou mais distantes da STR, que são marcadas pelos oligonucleotídeos iniciadores designados).

## QUADRO 9-1 MÉTODOS Poderosa ferramenta na medicina legal *(Continuação)*

O comprimento de uma STR particular em um indivíduo específico pode ser determinado com o auxílio da reação em cadeia da polimerase (ver Figura 9-12). O uso de PCR também torna o procedimento sensível o suficiente para ser aplicado a amostras muito pequenas de DNA recolhidas muitas vezes em cenas de crime. As sequências de DNA que acompanham as STR são exclusivas para cada *locus* STR e idênticas (exceto para mutações extremamente raras) em todos os humanos. Os oligonucleotídeos iniciadores da PCR são direcionados para esse DNA que acompanha a STR e são projetados para amplificar o DNA ao longo da STR (Figura Q-1a). O comprimento do produto da PCR, portanto, reflete o comprimento da STR nessa amostra. Como cada ser humano herda um cromossomo de cada par de cromossomos de cada progenitor, os comprimentos de STR nos dois cromossomos são frequentemente diferentes, gerando dois comprimentos de STR diferentes a partir de um indivíduo. Os produtos de PCR são submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida muito fino em um tubo capilar. As bandas resultantes são convertidas em um conjunto de picos que revelam com precisão o tamanho de cada fragmento de PCR e, assim, o comprimento da STR no alelo correspondente. A análise de múltiplos *loci* STR pode produzir um perfil exclusivo para um indivíduo (Figura Q-1b). Isso normalmente é realizado com um *kit* disponível comercialmente que inclui oligonucleotídeos iniciadores de PCR únicos para cada *locus*, ligados a corantes coloridos para ajudar a distinguir os diferentes produtos de PCR. A amplificação por PCR permite aos investigadores obter genótipos de STR de menos de 1 ng de DNA parcialmente degradado, quantidade que pode ser obtida a partir de um único folículo piloso, uma gota de sangue, uma pequena amostra de sêmen ou amostras com meses ou até mesmo vários anos de idade. Quando bons genótipos de STR são obtidos, a possibilidade de erros de identificação é inferior a 1 em $10^{18}$ (quintilhão).

A utilização forense bem-sucedida da análise de STR necessitou de padronização, conseguida pela primeira vez no Reino Unido em 1995. O padrão dos EUA, Combined DNA Index System (CODIS, sistema combinado do índice do DNA), criado em 1998, baseia-se em 13 *loci* STR bem estudados, que devem estar presentes em qualquer experimento de tipagem de DNA realizado nos Estados Unidos (Tabela Q-1). O gene amelogenina também é utilizado como marcador nas análises. Presente em cromossomos sexuais humanos, esse gene tem um comprimento um pouco diferente nos cromossomos X e Y. Assim, a amplificação por PCR por meio desse gene gera produtos de diferentes tamanhos que revelam o sexo do doador de DNA. Até o início de 2010, o banco de dados CODIS continha mais de 7 milhões de genótipos de STR e tinha auxiliado mais de 100.000 investigações forenses.

A genotipagem de DNA é utilizada tanto para condenar ou para absolver suspeitos e para estabelecer a paternidade com um extraordinário grau de certeza. O impacto desses procedimentos em casos de tribunal continuará a crescer à medida que os padrões forem aprimorados e os bancos de dados internacionais de genotipagem STR aumentarem. Mesmo casos misteriosos muito antigos poderão ser resolvidos. Em 1996, o *fingerprinting* de DNA ajudou a confirmar a identificação dos ossos do último czar russo e de sua família, que foram assassinados em 1918.

**TABELA Q-1** Propriedades dos *loci* utilizados para o banco de dados CODIS

| *Locus* | Cromossomo | Motivo de repetição | Comprimento da repetição (média)* | Número de alelos observados† |
|---|---|---|---|---|
| CSF1PO | 5 | TAGA | 5–16 | 20 |
| FGA | 4 | CTTT | 12,2–51,2 | 80 |
| TH01 | 11 | TCAT | 3–14 | 20 |
| TPOX | 2 | GAAT | 4–16 | 15 |
| VWA | 12 | [TCTG][TCTA] | 10–25 | 28 |
| D3S1358 | 3 | [TCTG][TCTA] | 8–21 | 24 |
| D5S818 | 5 | AGAT | 7–18 | 15 |
| D7S820 | 7 | GATA | 5–16 | 30 |
| D8S1179 | 8 | [TCTA][TCTG] | 7–20 | 17 |
| D13S317 | 13 | TATC | 5–16 | 17 |
| D16S539 | 16 | GATA | 5–16 | 19 |
| D18S51 | 18 | AGAA | 7–39,2 | 51 |
| D21S11 | 21 | [TCTA][TCTG] | 12–41,2 | 82 |
| Amelogenin‡ | X, Y | Não aplicado | | |

Fonte: Adaptado a partir de Butter, J.M. (2005) *Forensic DNA Typing*, 2nd edn, Academic Press, San Diego, p. 96.

*Comprimentos repetidos observados na população humana. As repetições parciais ou imperfeitas podem ser incluídas em alguns alelos.

†Número de diferentes alelos observados desde 2005 na população humana. A análise cuidadosa de um *locus* em vários indivíduos é um pré-requisito para seu uso na tipagem forense do DNA.

‡A amelogenina é um gene, de tamanho levemente diferente no cromossomo X e Y, utilizado para estabelecer o gênero.

a transcriptase reversa, uma enzima que funciona como uma DNA-polimerase (ver Figura 8-33a), mas utiliza o RNA como molde (Figura 9-12). Após a síntese da fita de DNA a partir do molde de RNA, os ciclos restantes podem ser feitos com DNA-polimerases, utilizando protocolos padrão de PCR. Essa **PCR pela transcriptase reversa** (**RT-PCR**) pode ser utilizada, por exemplo, para detectar sequências derivadas de células vivas (que fazem a transcrição de seu DNA em RNA) em oposição a tecidos mortos.

Protocolos de PCR também podem ser quantitativos para estimar o número de cópias relativas a sequências específicas em uma amostra. O método é chamado de **PCR quantitativa**, ou **qPCR**. Se uma sequência de DNA estiver presente em quantidades maiores que as habituais em uma amostra – por exemplo, se alguns genes são amplificados em células tumorais –, a qPCR pode revelar o aumento da representação daquela sequência. Em resumo, a PCR é realizada na presença de uma sonda que emite um sinal fluorescente quando o produto de PCR está presente (**Figura 9-13**). Se a sequência de interesse está presente em níveis mais elevados do que em outras sequências na amostra, o sinal de PCR irá atingir um limiar predeterminado mais rápido. A PCR de transcriptase reversa e a PCR em tempo real podem ser combinadas para determinar as concentrações relativas de uma molécula específica de RNA em uma célula em diferentes condições ambientais.

Finalmente, a PCR facilitou o desenvolvimento de novos procedimentos poderosos de sequenciamento de DNA, como será visto.

## RESUMO 9.1 Estudo dos genes e seus produtos

- A clonagem do DNA e a engenharia genética envolvem a clivagem do DNA e o conjunto de segmentos de DNA em novas combinações – DNA recombinante.
- A clonagem envolve cortar o DNA em fragmentos com enzimas; selecionar e possivelmente modificar um fragmento de interesse; inserir o fragmento de DNA em um vetor de clonagem adequado; transferir o vetor com o DNA inserido em uma célula hospedeira para a replicação; e identificar e selecionar células que contêm o fragmento de DNA.
- Enzimas essenciais na clonagem gênica incluem endonucleases de restrição (especialmente as enzimas tipo II) e a DNA-ligase.
- Vetores de clonagem incluem plasmídeos e, para as inserções de DNA mais longas, cromossomos artificiais de bactérias (BAC) e cromossomos artificiais de leveduras (YAC).
- Técnicas de engenharia genética manipulam células para expressar e/ou alterar genes clonados.
- As proteínas ou peptídeos podem se ligar a uma proteína de interesse alterando o seu gene clonado, criando uma proteína de fusão. Os segmentos de peptídeos adicionais podem ser utilizados para detectar a proteína ou purificá-la utilizando métodos de cromatografia de afinidade convenientes.
- A reação em cadeia da polimerase (PCR) permite a amplificação de segmentos escolhidos de DNA ou RNA para estudo detalhado ou clonagem.

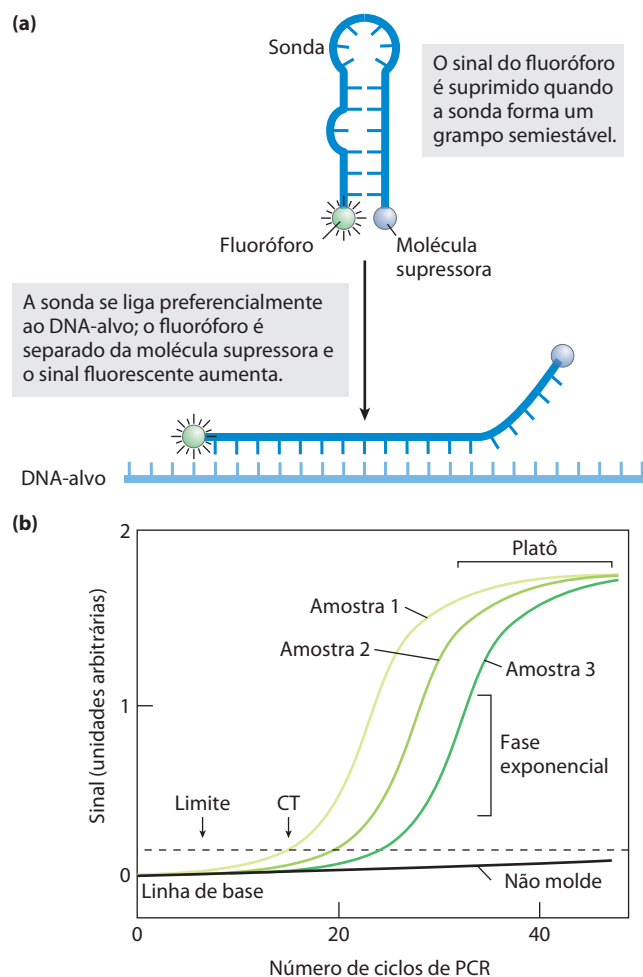



**FIGURA 9-13 PCR quantitativa.** A PCR pode ser utilizada quantitativamente, monitorando-se cuidadosamente o progresso da amplificação da PCR e determinando quando um segmento de DNA foi amplificado para um nível limite específico. **(a)** A quantidade de produto de PCR presente é determinada medindo-se o nível de uma sonda fluorescente ligada a um oligonucleotídeo repórter complementar ao segmento de DNA que está sendo amplificado. A fluorescência da sonda não é detectada inicialmente porque um supressor de fluorescência é ligado ao mesmo nucleotídeo. Quando o oligonucleotídeo repórter se pareia com seu complemento em uma cópia do segmento de DNA amplificado, o fluoróforo se separa da molécula supressora e a fluorescência aparece. **(b)** À medida que prossegue a reação de PCR, a quantidade de segmento de DNA-alvo aumenta exponencialmente, e o sinal fluorescente também aumenta exponencialmente à medida que as sondas de oligonucleotídeos se ligam aos segmentos amplificados. Após vários ciclos de PCR, o sinal alcança um platô à medida que um ou mais componentes da reação se extinguem. Quando um segmento está presente em quantidades maiores em uma amostra do que em outra, sua amplificação atinge um limiar predefinido. A linha "Não molde" segue o lento aumento no sinal de fundo observado em um controle que não inclui uma amostra de DNA adicionada. CT é o número de ciclos no qual o limiar é ultrapassado primeiro.

## 9.2 Utilização de métodos com base no DNA para a compreensão das funções das proteínas

A função das proteínas pode ser descrita em três níveis. A **função fenotípica** descreve os efeitos de uma proteína em todo o organismo. Por exemplo, a perda de proteínas pode levar a um crescimento mais lento do organismo, a uma alteração no padrão de desenvolvimento ou até mesmo

à morte do organismo. A **função celular** é a descrição de uma rede de interações em que as proteínas participam no nível celular. A identificação de interações com outras proteínas na célula pode ajudar a definir os tipos de processos metabólicos nos quais a proteína participa. Finalmente, a **função molecular** refere-se à atividade bioquímica precisa de uma proteína, incluindo detalhes como as reações que uma enzima catalisa ou os ligantes que ligam a um receptor. O desafio de compreender as funções de milhares de proteínas não caracterizadas ou mal caracterizadas encontradas em uma célula comum originou uma grande variedade de técnicas. Os métodos com base no DNA são uma contribuição fundamental para esse esforço e fornecem informações em todos os três níveis.

## Bibliotecas de DNA são catálogos especializados de informação genética

Uma **biblioteca de DNA** é uma coleção de clones de DNA reunidos para fins de sequenciamento do genoma, descoberta de genes ou a determinação da função de um gene/proteína. A biblioteca pode ter diversas formas, dependendo da fonte de DNA e do propósito final da biblioteca.

A maior é uma **biblioteca genômica**, produzida quando o genoma completo de um organismo é clivado em milhares de fragmentos. Todos os fragmentos são clonados por inserção de cada fragmento em um vetor de clonagem. Isso cria uma mistura complexa de vetores recombinantes, cada um com um fragmento clonado diferente. A primeira etapa é a digestão *parcial* do DNA por endonucleases de restrição, de forma que qualquer sequência apareça em fragmentos em um número limitado de tamanhos – uma faixa de tamanhos compatível com o vetor de clonagem para assegurar que praticamente todas as sequências estejam representadas entre os clones na biblioteca. Os fragmentos muito grandes ou muito pequenos para a clonagem são removidos por centrifugação ou eletroforese. O vetor de clonagem, como BAC ou YAC, é clivado com a mesma endonuclease de restrição utilizada para digerir o DNA e ligado aos fragmentos de DNA genômico. A mistura de DNA ligado é então utilizada para transformar células bacterianas ou de leveduras para produzir uma biblioteca de células, cada qual abrigando uma molécula diferente de DNA recombinante. Idealmente, todo o DNA no genoma em estudo é representado na biblioteca. Cada célula bacteriana ou de levedura cresce em uma colônia ou clone de células idênticas, cada célula com o mesmo plasmídeo recombinante, um dos muitos representados na biblioteca total.

Os esforços para definir a função de um gene ou proteína muitas vezes se utilizam de bibliotecas mais especializadas. Um exemplo é uma biblioteca que inclui apenas as sequências de DNA *expressas*, isto é, transcritas em um RNA – em determinado organismo, ou mesmo em apenas algumas células ou tecidos. Essa biblioteca não tem o DNA não codificante que faz parte de grande parte de muitos genomas eucarióticos. Em primeiro lugar, o pesquisador extrai o mRNA de um organismo ou de células específicas de um organismo e, em seguida, prepara os **DNA complementares** (**cDNA**). Essa reação em múltiplas etapas, mostrada na **Figura 9-14**, depende da transcriptase reversa, que sintetiza DNA a partir de um molde de RNA. Os fragmentos de DNA de cadeia dupla resultante são inseridos num vetor adequado e clonados, criando uma população de clones chamada de **biblioteca de cDNA**. O aparecimento de um gene para uma determinada proteína nessa biblioteca implica que ele é expresso nas células e sob as condições utilizadas para gerar a biblioteca.

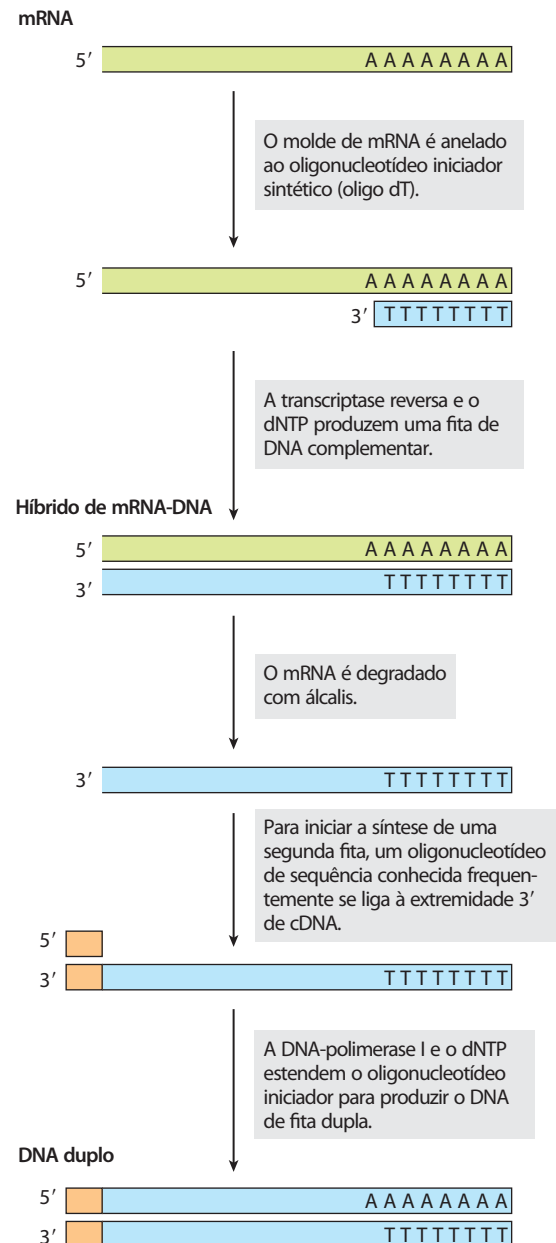



**FIGURA 9-14 Construindo uma biblioteca de cDNA a partir de mRNA.** O conteúdo total de mRNA de uma célula inclui os transcritos de milhares de genes, e os cDNAs gerados desse mRNA são correspondentemente heterogêneos. A transcriptase reversa pode sintetizar DNA em um molde de RNA ou DNA (ver Figura 26-32). Para iniciar a síntese da segunda fita de DNA, os oligonucleotídeos de sequência conhecida se ligam à extremidade 3′ da primeira fita, e o cDNA de fita dupla então produzido é clonado em um plasmídeo.

## Sequências ou relações estruturais fornecem informações sobre a função das proteínas

Uma razão importante para se sequenciar muitos genomas é fornecer um banco de dados capaz de atribuir funções de genes por comparações do genoma, empreendimento conhecido como **genômica comparativa**. Algumas vezes, um gene recém-descoberto é relatado por homologias de sequências de um gene previamente estudado em outra ou na mesma espécie, e a sua função pode ser total ou parcialmente definida por essa relação. Os genes que ocorrem em espécies diferentes, mas têm uma sequência e uma relação funcional clara entre si, são chamados **ortólogos**. Genes com relações semelhantes entre si, dentro de uma única espécie, são chamados de **parálogos**. Se a função de um gene foi caracterizada para uma espécie, essa informação pode ser utilizada para, ao menos, atribuir provisoriamente a função do gene para o ortólogo encontrado em uma segunda espécie. A correlação é mais fácil de ser realizada quando se comparam genomas de espécies com relativa proximidade, como camundongos e humanos, embora muitos genes claramente ortólogos tenham sido identificados em espécies tão distantes quanto as bactérias e os seres humanos. Algumas vezes, até mesmo a ordem dos genes em um cromossomo é conservada ao longo de grandes segmentos de genomas de espécies estreitamente relacionadas (**Figura 9-15**). A ordem gênica conservada, chamada **sintenia**, fornece evidência adicional para uma relação ortóloga entre genes em locais idênticos dentro dos segmentos relacionados.

Alternativamente, algumas sequências associadas a determinados motivos estruturais (Capítulo 4) podem ser identificadas em uma proteína. A presença de um motivo estrutural pode ajudar a definir a função molecular, sugerindo que uma proteína, por exemplo, catalisa a hidrólise de ATP, liga-se ao DNA ou forma um complexo com íons de zinco. Essas relações são determinadas com a ajuda de programas de computador sofisticados, limitados apenas pela informação atual sobre a estrutura do gene e da proteína e pela capacidade para associar sequências com motivos estruturais determinados.

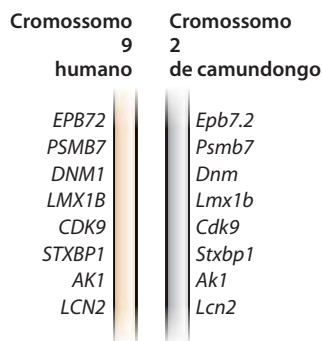



**FIGURA 9-15 Sintenia em genomas humanos e de camundongos.** Segmentos grandes dos dois genomas têm genes intimamente relacionados alinhados na mesma ordem nos cromossomos. Nos segmentos curtos do cromossomo 9 humano e no cromossomo 2 de camundongo, os genes exibem alto grau de homologia, assim como a mesma ordem no gene. Os diferentes esquemas de letras para os nomes dos genes simplesmente refletem as diferentes convenções de nomenclatura nas duas espécies.

## Proteínas de fusão e imunofluorescência podem localizar proteínas em células

Muitas vezes, uma pista importante para a função de um produto gênico surge pela determinação de sua localização no interior da célula. Por exemplo, uma proteína que se encontra exclusivamente no núcleo pode estar envolvida em processos exclusivos dessa organela, tais como transcrição, replicação ou condensação da cromatina. Com frequência, pesquisadores modificam geneticamente proteínas de fusão com a finalidade de localizar uma proteína na célula ou organismo. Algumas das fusões mais úteis envolvem a ligação de proteínas marcadoras que permitem ao investigador determinar a localização por visualização direta ou por imunofluorescência.

Um marcador particularmente útil é a **proteína fluorescente verde** (**GFP**). Um gene-alvo (que codifica a proteína de interesse) fusionado ao gene de GFP gera uma proteína de fusão altamente fluorescente – ela literalmente acende quando exposta à luz azul – e pode ser visualizada diretamente em uma célula viva. A GFP é uma proteína derivada da água-viva *Aequorea victoria* (ver Quadro 12-3, Figura 1). Ela tem estrutura em barril $\beta$ e o fluoróforo (o componente fluorescente da proteína) está no centro do barril (**Figura 9-16a**). O fluoróforo é derivado de um rearranjo e oxidação de vários resíduos de aminoácidos. Como essa reação é autocatalítica e não exige outras proteínas ou outros cofatores além do oxigênio molecular (ver Quadro 12-3, Figura 3), a GFP é prontamente clonada em uma forma ativa em quase todas as células. Apenas algumas moléculas dessa proteína podem ser observadas ao microscópio, permitindo o estudo de sua localização e movimentos em uma célula. Uma cuidadosa modificação genética da proteína, associada ao isolamento de proteínas fluorescentes relacionadas provenientes de outros celenterados marinhos, disponibilizou uma ampla variedade dessas proteínas, em um conjunto de cores (Figura 9-16b) e outras características (brilho, estabilidade). Com essa tecnologia, por exemplo, a proteína GLR1 (receptor de glutamato do tecido nervoso) foi visualizada como proteína de fusão GLR1-GFP no nematódeo *Caenorhabditis elegans* (Figura 9-16c).

Em muitos casos, a visualização de uma proteína de fusão GFP em uma célula viva real não é possível, prática ou desejável. A proteína de fusão GFP pode estar inativa ou pode não ser expressa em níveis suficientes para permitir a visualização. Nesse caso, a **imunofluorescência** é um método alternativo para a visualização da proteína endógena (inalterada). Esse método requer a fixação (e, portanto, a morte) da célula. A proteína de interesse é algumas vezes expressa como uma proteína de fusão com um **marcador de epítopo**, sequência proteica curta que se liga firmemente a um anticorpo bem caracterizado e disponível comercialmente. As moléculas fluorescentes (fluorocromos) estão ligadas a esse anticorpo. Mais comumente, a proteína-alvo permanece inalterada. Essa proteína está ligada por um anticorpo que é específico para ela. Em seguida, um segundo anticorpo é adicionado e se liga especificamente ao primeiro, e é o segundo anticorpo, que tem o(s) fluorocromo(s) ligado(s) (**Figura 9-17a**). Uma variação desse método de visualização indireta é ligar moléculas de biotina ao primeiro anticorpo e, em seguida, adicionar estreptavidina (proteína bacteriana intimamente relaciona-

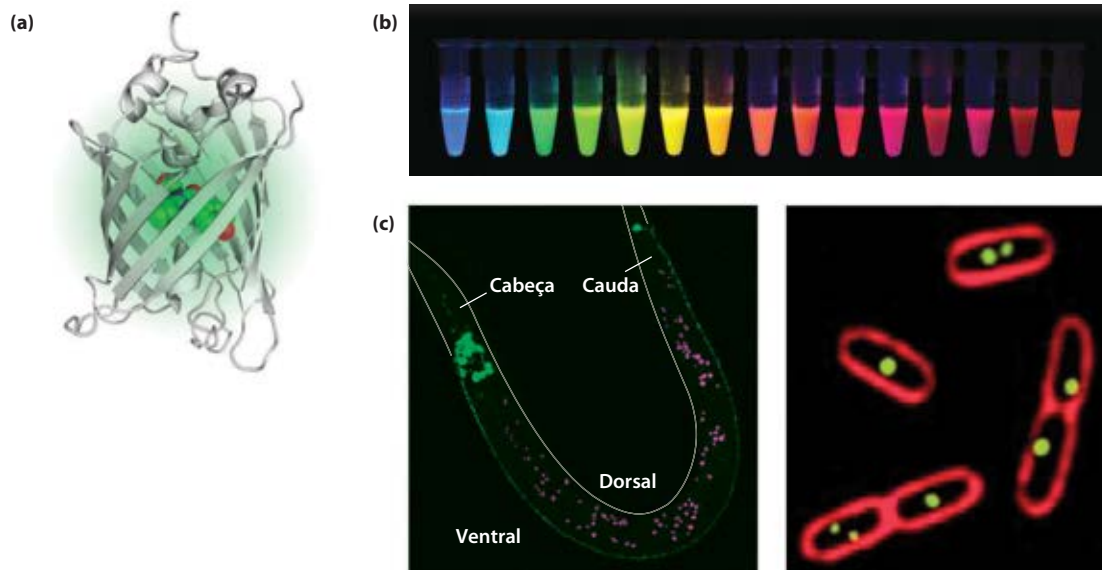



**FIGURA 9-16 Proteína fluorescente verde (GFP). (a)** A proteína GFP (PDB ID 1GFL), derivada da água-viva *Aequorea victoria*, tem estrutura em barril $\beta$; o fluoróforo (apresentado como modelo de volume atômico) é o centro do barril. **(b)** Variantes de GFP estão disponíveis atualmente em quase todas as cores do espectro visível. **(c)** Uma proteína de fusão GLR1-GFP tem brilho fluorescente verde brilhante no verme nematódeo *Caenorhabditis elegans* (à esquerda). A GLR1 é um receptor de glutamato do tecido nervoso (gotas de gordura autofluorescente se colorem falsamente de magenta). As membranas das células de *E. coli* (à direita) são coradas com corante fluorescente vermelho. As células estão expressando uma proteína que se liga a um plasmídeo residente, fusionado com GFP. Os pontos verdes indicam as posições dos plasmídeos.

da à avidina, proteína que se liga à biotina; ver Tabela 5-1) complexada com fluorocromos. A interação entre a biotina e a estreptavidina é uma das interações mais fortes e mais específicas conhecidas, e o potencial para adicionar múltiplos fluorocromos para cada proteína-alvo confere a esse método uma grande sensibilidade.

Bibliotecas de cDNA altamente especializadas (Figura 9-14) podem ser feitas por clonagem de cDNA ou de fragmentos de cDNA em um vetor que se fusiona a cada sequência de cDNA com a sequência para um marcador chamado de gene repórter. O gene fusionado é frequentemente chamado de construtor repórter. Por exemplo, todos os genes na biblioteca podem ser fusionados com o gene da GFP (**Figura 9-18**). Cada célula na biblioteca expressa um desses genes fusionados. A localização celular do produto de qualquer gene representado na biblioteca será revelada em forma de focos de luz em células que expressam o gene fusionado adequado em níveis suficientes – supondo-se que o gene mantenha a sua função e localização normal.

## Interações proteína-proteína ajudam a elucidar a função de proteínas

Outra chave para definir a função de uma proteína específica é determinar o quê se liga a essa proteína. No caso de interações proteína-proteína, a associação de uma proteína

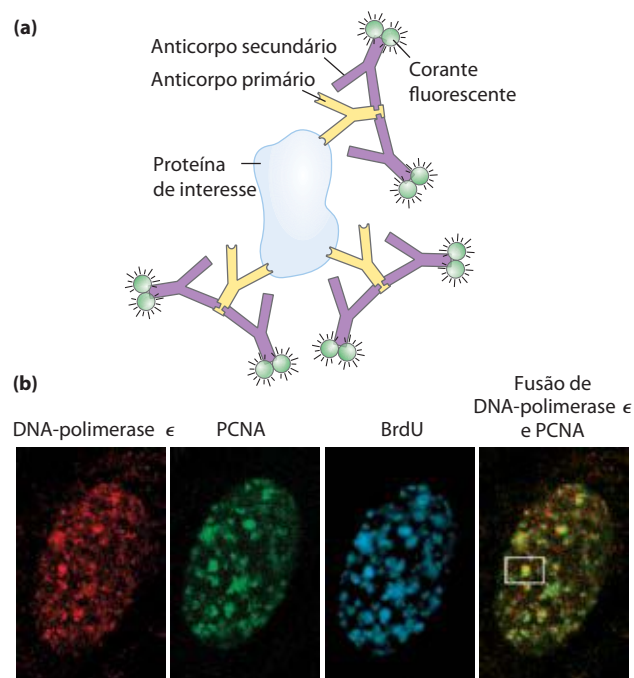



**FIGURA 9-17 Imunofluorescência indireta. (a)** A proteína de interesse se liga ao anticorpo primário, e um anticorpo secundário é adicionado; este segundo anticorpo, com um ou mais grupos fluorescentes ligados, se liga ao primeiro. Múltiplos anticorpos secundários podem se ligar ao anticorpo primário, amplificando o sinal. Se a proteína de interesse está no interior de uma célula, a célula é fixada e permeabilizada, e os dois anticorpos são adicionados em sucessão. **(b)** O resultado final é uma imagem na qual os pontos brilhantes indicam a localização da proteína ou proteínas de interesse na célula. As imagens mostram um núcleo de um fibroblasto humano, sucessivamente corado com anticorpos e marcadores fluorescentes para DNA-polimerase $\varepsilon$, para PCNA, importante proteína acessória da polimerase, e para bromodesoxiuridina (BrdU), análogo de nucleotídeo. A BrdU, adicionada como um breve pulso, identifica as regiões de replicação ativa de DNA. Os padrões de coloração mostram que a DNA-polimerase $\varepsilon$ e o PCNA se colocalizam em regiões de síntese de DNA ativa. Uma dessas regiões é visível no quadro branco.

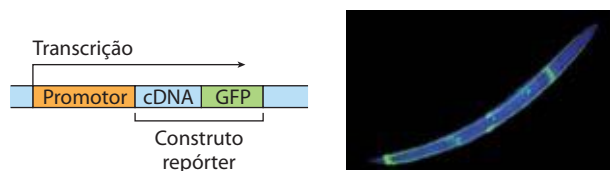



**FIGURA 9-18 Bibliotecas especializadas de DNA.** A clonagem de um cDNA próximo ao gene de GFP cria um construto repórter. A transcrição prossegue por meio do gene de interesse (o cDNA inserido) e o gene repórter (aqui, o de GFP), e o transcrito de mRNA é expresso como uma proteína de fusão. Parte da proteína GFP é visível ao microscópio com fluorescência. Embora seja mostrado apenas um exemplo, milhares de genes podem ser fusionados com GFP em construtos similares e armazenados em bibliotecas nas quais cada célula ou organismo, na biblioteca, expressa uma proteína diferente fusionada à GFP. Se a proteína de fusão é adequadamente expressa, sua localização na célula ou organismo pode ser avaliada. A fotografia mostra um nematódeo contendo uma proteína de fusão GFP expressa apenas nos quatro neurônios "de toque" que percorrem o comprimento do seu corpo.

de função desconhecida àquela cuja função é conhecida pode fornecer uma "culpa por associação" útil e atraente. As técnicas utilizadas nesse esforço são bastante variadas.

**Purificação de complexos de proteínas** Com a construção de bibliotecas de cDNA em que cada gene é fusionado a um marcador de epítopo, os investigadores podem precipitar o produto proteico de um gene por meio de sua complexação com o anticorpo que se liga ao epítopo, processo denominado **imunoprecipitação** (**Figura 9-19**). Se a proteína marcada é expressa em células, outras proteínas que se ligam a ela também precipitam com ela. A identificação de proteínas associadas revela algumas das interações proteína-proteína da proteína marcada. Há muitas variações desse processo. Por exemplo, um extrato bruto de células que expressa uma proteína marcada é adicionado a uma coluna contendo anticorpos imobilizados (ver na Figura 3-17c uma descrição de cromatografia de afinidade). A proteína marcada se liga ao anticorpo, e, às vezes, proteínas que interagem com a proteína marcada também são retidas na coluna. A conexão entre a proteína e o marcador é clivada com uma protease específica e os complexos de proteínas são eluídos a partir da coluna e analisados. Os pesquisadores utilizam esses métodos para definir redes complexas de interações no interior de uma célula. Em princípio, o método cromatográfico para analisar interações proteína-proteína é utilizado com qualquer tipo de marcador de proteína (marcador His, GST, etc.) que possa ser imobilizado em meio cromatográfico adequado.

A seletividade desse método foi potencializada com os **marcadores de purificação por afinidade em tandem** (**TAP**). Dois marcadores consecutivos são fusionados a uma proteína-alvo, e a proteína de fusão é expressa em uma célula (**Figura 9-20**). O primeiro marcador é a proteína A, encontrada na superfície da bactéria *Staphylococcus aureus* que se liga firmemente à imunoglobulina G (IgG) de mamíferos. O segundo marcador é frequentemente um peptídeo de ligação de calmodulina. Um extrato bruto contendo a proteína de fusão marcadora de TAP é passado por uma matriz de coluna com anticorpos IgG fixados que se ligam à proteína A. A maior parte das proteínas celulares não ligadas é lavada pela coluna, mas as proteínas que normalmente interagem com a proteína-alvo na célula são retidas. O primeiro marcador é, então, clivado a partir da

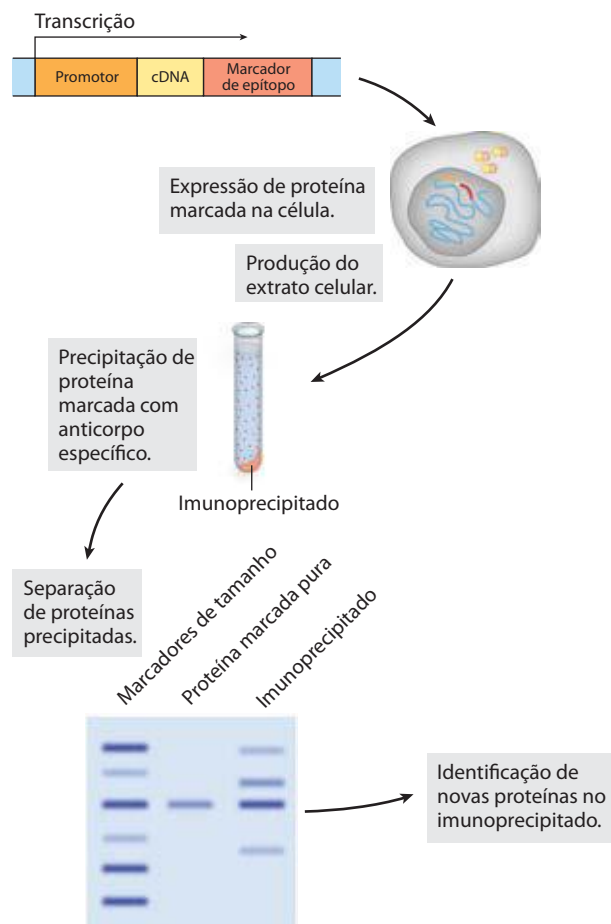



**FIGURA 9-19 O uso de marcadores de epítopos para estudar interações proteína-proteína.** O gene de interesse é clonado próximo a um gene para um marcador de epítopo, e a proteína de fusão resultante é precipitada por anticorpos para o epítopo. Todas as outras proteínas que interagem com a proteína marcada também precipitam, contribuindo assim para elucidar as interações proteína-proteína.

proteína de fusão com uma protease altamente específica, a protease TEV, e a proteína-alvo de fusão encurtada e quaisquer outras proteínas associadas de modo não covalente à proteína-alvo são eluídas na coluna. O eluente, então, passa por uma segunda coluna contendo uma matriz com calmodulina fixada, que liga o segundo marcador. Proteínas ligadas frouxamente voltam a ser lavadas ao longo da coluna. Após a clivagem do segundo marcador, a proteína-alvo é eluída ao longo da coluna com suas proteínas associadas. As duas etapas de purificação consecutivas eliminam todos os contaminantes fracamente ligados. Falsos-positivos são minimizados e as interações proteicas que persistem em ambas as etapas podem ser funcionalmente significativas.

**Análise de duplos-hídridos em leveduras** Um método genético sofisticado para definir interações proteína-proteína se baseia nas propriedades da proteína Gal4 (Gal4p; ver Figura 28-30), que ativa a transcrição de genes *GAL* em genes de leveduras, que codificam as enzimas do metabolismo da galactose. A Gal4p tem dois domínios: um que se liga a uma sequência específica de DNA e outro que ativa a RNA-polimerase para sintetizar mRNA a partir de um gene adjacente.

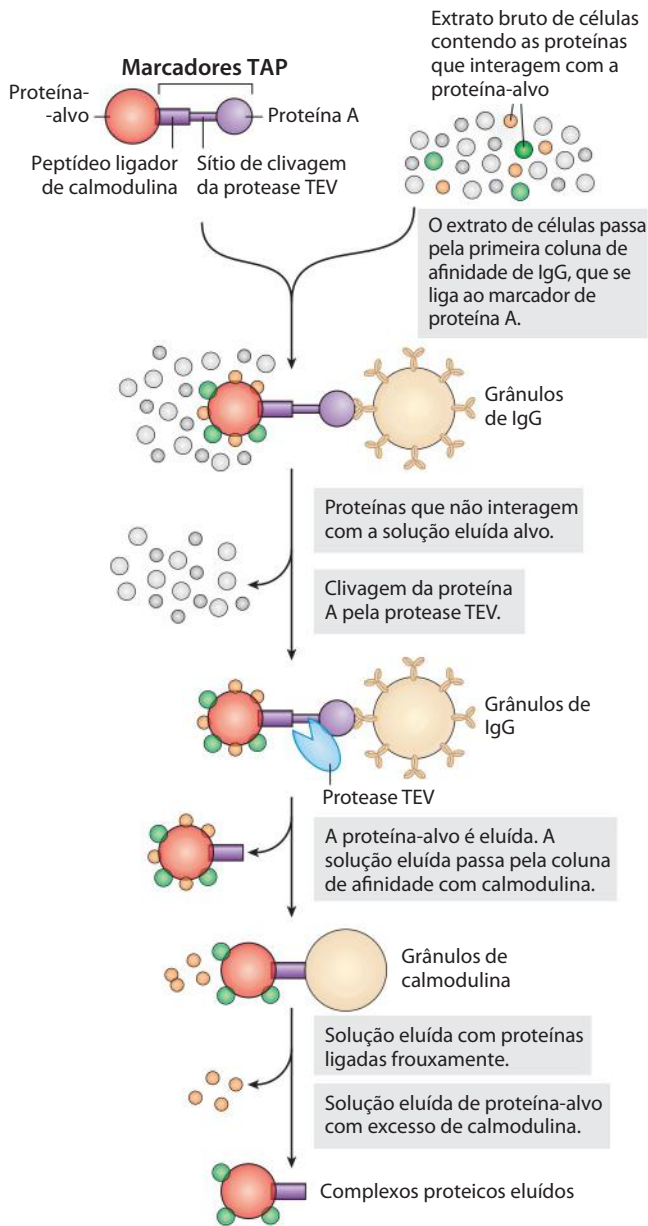



**FIGURA 9-20 Marcadores por purificação de afinidade em tandem (TAP).** Uma proteína marcada com TAP e proteínas associadas são isoladas por duas purificações de afinidade consecutivas, conforme descrito no texto.

Os dois domínios de Gal4p são estáveis quando separados, mas a ativação da RNA-polimerase exige a interação com o domínio de ativação que, por sua vez, necessita de posicionamento próximo do domínio de ligação do DNA. Assim, os domínios devem ser reunidos para funcionar corretamente.

Na **análise de duplo-híbrido em leveduras**, as regiões codificadoras de proteínas gênicas analisadas são fusionadas ao gene da levedura tanto ao domínio de ligação do DNA quanto ao domínio de ativação de Gal4p, e os genes resultantes expressam várias proteínas de fusão. (**Figura 9-21**). Se uma proteína fusionada ao domínio de ligação do DNA interage com uma proteína fusionada ao domínio de ativação, a transcrição é ativada. O gene repórter transcrito por essa ativação é geralmente o que produz uma proteína necessária para o cultivo ou uma enzima que catalisa uma reação com um produto colorido. Desse modo, quando cultivadas em meio adequado, as células que contêm um par de proteínas em interação são facilmente distinguidas das células que não o têm. Uma biblioteca pode ser configurada com uma linhagem de levedura específica, na qual cada célula na biblioteca tem um gene fusionado com o gene do domínio de ligação do DNA de Gal4p, e muitos desses genes estão representados na

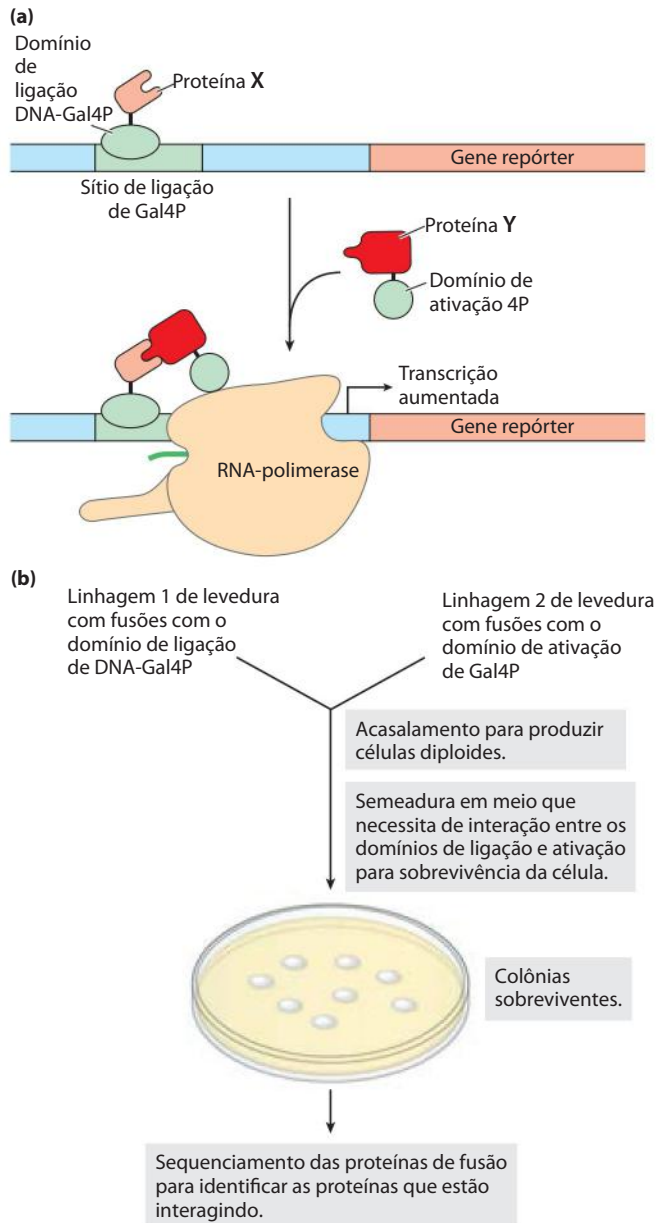



**FIGURA 9-21 Análise de duplo-híbrido em leveduras. (a)** O objetivo é reunir o domínio de ligação do DNA e o domínio de ativação da proteína de levedura Gal4 (Gal4p) pela interação de duas proteínas, X e Y, à qual um dos domínios se funde. Esta interação é acompanhada pela expressão de um gene repórter. **(b)** As duas fusões de genes são criadas em linhagens de leveduras separadas, sendo então colocadas para reproduzir. A mistura que sofre reprodução é semeada em um meio em que as leveduras não podem sobreviver a menos que o gene repórter seja expresso. Assim, todas as colônias sobreviventes têm proteínas de fusão interagindo. O sequenciamento das proteínas de fusão nas colônias sobreviventes revela quais proteínas estão interagindo.

biblioteca. Em uma segunda linhagem de leveduras, um gene de interesse é fusionado com o gene para o domínio de ativação de Gal4p. As linhagens de leveduras são reproduzidas e as células diploides individuais são cultivadas em colônias. As únicas células que crescem no meio seletivo e produzem a cor adequada são aquelas em que o gene de interesse está ligado a um parceiro, permitindo a transcrição do gene repórter. Isso permite a triagem em larga escala de proteínas celulares que interagem com a proteína-alvo. A proteína de interação, fusionada com o domínio de ligação do DNA de Gal4p, presente em uma determinada colônia selecionada, pode ser rapidamente identificada por sequenciamento de DNA do gene da proteína de fusão. Alguns resultados falsos positivos ocorrem devido à formação de complexos multiproteicos.

Essas técnicas para a determinação da localização celular e interações moleculares fornecem pistas importantes para a função da proteína. Entretanto, elas não substituem a bioquímica clássica. Simplesmente fornecem aos pesquisadores um acesso rápido a novos e importantes problemas biológicos. Quando combinadas às ferramentas da bioquímica e biologia molecular em evolução simultânea, as técnicas descritas aqui aceleram a descoberta não apenas de novas proteínas, mas de novos processos e mecanismos biológicos.

## Microarranjos de DNA revelam padrões de expressão de RNA e outras informações

Os principais refinamentos posteriores da tecnologia de bibliotecas de DNA, a PCR e a hibridização se uniram no desenvolvimento de **microarranjos de DNA** que permitem a triagem rápida e simultânea de muitos milhares de genes. Segmentos de DNA de genes de sequências conhecidas, com algumas dezenas de centenas de pares de bases de comprimento, são amplificados por PCR. Dispositivos robóticos então depositam quantidades precisas de nanolitros de soluções de DNA sobre uma superfície sólida de poucos centímetros quadrados, em um arranjo predefinido, com cada um dos milhares de pontos contendo sequências derivadas de um determinado gene. Uma estratégia alternativa e cada vez mais comum para a síntese de DNA diretamente sobre uma superfície sólida utiliza a fotolitografia (**Figura 9-22**). O arranjo resultante, muitas vezes chamado de um *chip*, pode incluir sequências derivadas de cada gene de um genoma

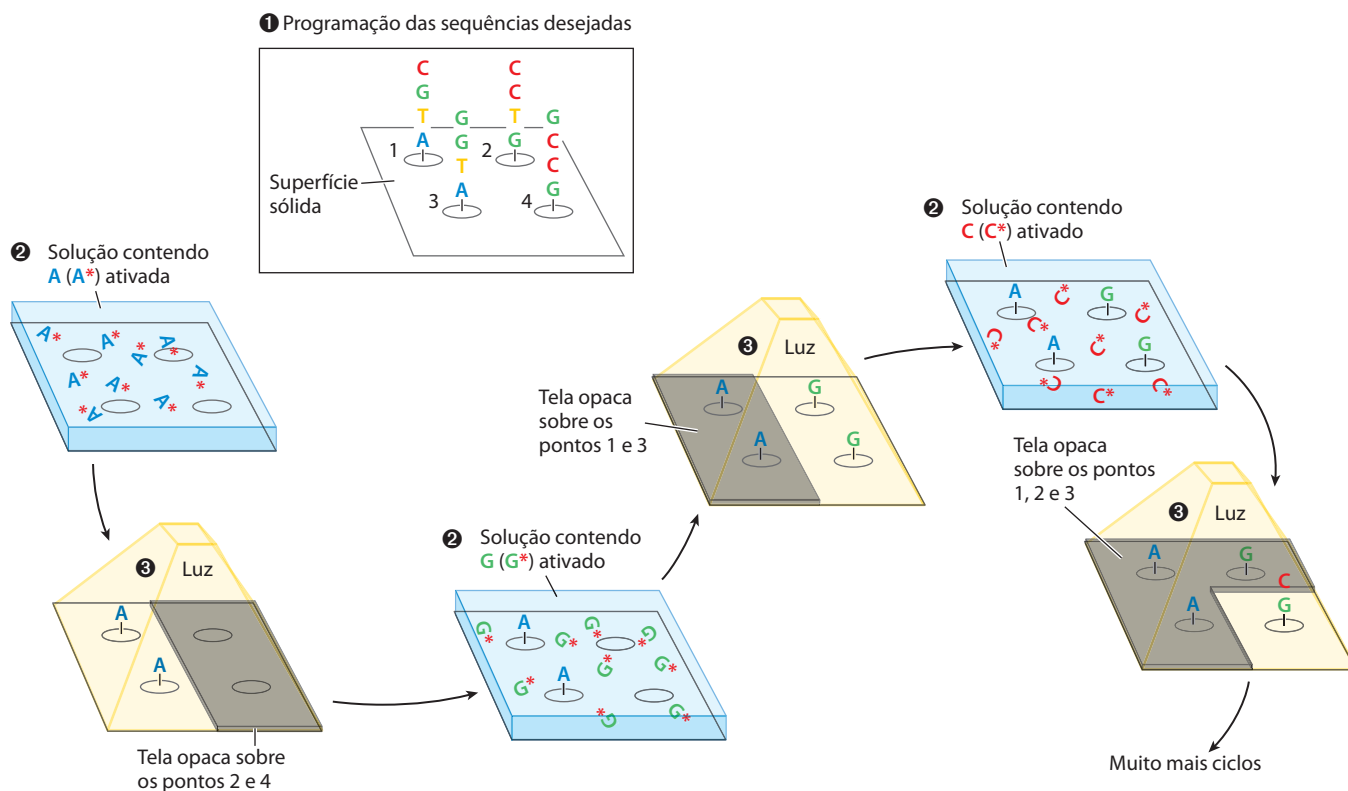



**FIGURA 9-22 Fotolitografia para criar um microarranjo de DNA.** ❶ Um computador é programado com as sequências de oligonucleotídeos desejadas. ❷ Os grupos reativos, ligados a uma superfície sólida, são inicialmente inativados pelos grupos de bloqueio fotoativos, que podem ser removidos por um *flash* de luz. Uma tela opaca bloqueia a luz de algumas áreas da superfície, impedindo sua ativação. Outras áreas ou "pontos" são expostos. ❸ Uma solução contendo um nucleotídeo ativado (p. ex., A*****) é lavada sobre os pontos. O grupo 5′-hidroxila do nucleotídeo é bloqueado para impedir reações indesejadas, e o nucleotídeo se liga aos grupos de superfície em pontos apropriados sobre seu grupo 3′-hidroxila. A superfície é lavada sucessivamente com soluções contendo cada nucleotídeo ativado remanescente (G*****, C*****, T*****). Os grupos bloqueadores 5′ em cada nucleotídeo limitam as reações à adição de um nucleotídeo por vez, e esses grupos também podem ser removidos pela luz. Quando cada ponto tem um nucleotídeo, um segundo nucleotídeo pode ser adicionado para ampliar o nucleotídeo nascente em cada ponto, utilizando telas e luz para assegurar que serão adicionados os nucleotídeos em cada ponto da sequência correta. Este processo continua até que as sequências necessárias sejam construídas em cada um dos milhares de pontos no microarranjo do DNA.

bacteriano ou de levedura, ou de famílias de genes selecionados a partir de um genoma maior. Quando construído, o microarranjo pode ser sondado com mRNA ou cDNA a partir de um determinado tipo celular ou cultura de células para identificar os genes que são expressos nessas células.

Um microarranjo pode fornecer um panorama de todos os genes de um organismo, informando ao pesquisador sobre os genes expressos em determinada fase do desenvolvimento de um organismo ou em um conjunto particular de condições ambientais. Por exemplo, o complemento total de mRNA pode ser isolado a partir de células em duas fases diferentes de desenvolvimento e convertido a cDNA com transcriptase reversa. Desoxirribonucleotídeos marcados por fluorescência podem ser utilizados para tornar uma amostra de cDNA fluorescente vermelha e outra verde (**Figura 9-23**). O cDNA das duas amostras é misturado e utilizado para fazer uma sonda no microarranjo. Cada cDNA se anela em um único ponto no microarranjo, correspondendo ao gene que codifica o mRNA, que deu origem ao cDNA. Pontos que apresentam fluorescência verde representam genes que produzem mRNA em níveis mais elevados em um estágio de desenvolvimento; aqueles que apresentam fluorescência vermelha representam genes expressos em níveis mais elevados em outra fase. Se um gene produz mRNA em igual abundância em ambas as fases de desenvolvimento, o ponto correspondente apresenta fluorescência amarela. Utilizando uma mistura de duas amostras para medir a abundância de sequências relativa e não absoluta, o método corrige as variações na quantidade de DNA originalmente depositado em cada ponto do gráfico, bem como outras possíveis inconsistências entre pontos no microarranjo. Os pontos que apresentam fluorescência fornecem um panorama de todos os genes expressos nas células no momento em que foram colhidos – expressão gênica examinada em uma escala do genoma total. Para um gene de função desconhecida, o tempo e as circunstâncias da sua expressão podem fornecer pistas importantes sobre o seu papel na célula. Essas tecnologias também revelam a expressão de muitos tipos de RNA especializados, tais como microRNA (miRNA; Capítulo 26) e RNA de interferência pequenos (siRNA; Capítulo 28).

Um exemplo dessa técnica é ilustrado na **Figura 9-24**, que mostra os resultados impressionantes produzidos pelos experimentos de microarranjos. Os segmentos de cada um dos cerca de 6.500 genes no genoma de leveduras completamente sequenciado foram amplificados separadamente por PCR, e cada segmento foi depositado em um padrão definido para criar o microarranjo. Em certo sentido, esse arranjo fornece uma visão instantânea do panorama do funcionamento da totalidade do genoma da levedura, em um conjunto de condições.

**FIGURA 9-23** **Experimento com microarranjo de DNA.** Um microarranjo pode ser preparado a partir de qualquer sequência conhecida de DNA, de qualquer fonte. Quando o DNA se liga a um suporte sólido, outros ácidos nucleicos marcados com fluorescência podem servir como sondas para o microarranjo. Aqui, amostras de mRNA foi retiradas de células de um sapo em dois estágios diferentes de desenvolvimento.

## RESUMO 9.2 Utilização de métodos com base no DNA para a compreensão das funções das proteínas

- As proteínas são estudadas no nível da função fenotípica, celular ou molecular.
- As bibliotecas de DNA são um prelúdio para muitos tipos de investigações que produzem informação sobre a função de proteínas.
- Fusionando um gene de interesse com os genes que codificam a proteína fluorescente verde ou marcadores de epítopos, os pesquisadores podem visualizar a localização celular do produto gênico, tanto diretamente quanto por meio de imunofluorescência.
- As interações de uma proteína com outras proteínas ou com o RNA podem ser investigadas por meio de marca-

**FIGURA 9-24 Imagem ampliada de um microarranjo de DNA.** Cada ponto brilhante contém o DNA dos cerca de 6.500 genes do genoma de levedura (*S. cerevisiae*), com cada gene representado no arranjo. As sondas do microarranjo são os ácidos nucleicos marcados com fluorescência derivados de mRNA obtidos nas células em crescimento nos meios de cultura (em verde) e 5 horas após o início da formação dos esporos (em vermelho). Os pontos verdes representam os genes expressos em níveis elevados durante o crescimento; os pontos vermelhos, os genes expressos em níveis elevados durante a esporulação. Os pontos amarelos representam os genes que não mudam seu nível de expressão durante a esporulação. Esta imagem está aumentada; na verdade, o microarranjo mede apenas 1,8 × 1,8 cm.

dores de epítopos e imunoprecipitação ou cromatografia de afinidade. A análise de duplo-híbrido de levedura fornece sondas de interações moleculares *in vivo*.

- Os microarranjos podem revelar padrões de expressão gênica que se alteram em resposta a estímulos, estágio de desenvolvimento ou condições celulares.

## 9.3 Genômica e história da humanidade

Os métodos de sequenciamento de DNA descritos no Capítulo 8 levaram às primeiras sequências genômicas completas de espécies bacterianas na década de 1990. Duas sequências do genoma humano completo surgiram em 2001. Uma delas foi gerada por um esforço de financiamento público, liderado inicialmente por James Watson e posteriormente por Francis Collins. Em paralelo, esforços privados foram liderados por Craig Venter. Essas conquistas se refletiram em mais de uma década de intensos esforços coordenados em dezenas de laboratórios ao redor do mundo e foram apenas o começo. Os bancos de dados de sequências de DNA contêm agora as sequências genômicas completas de milhares de organismos de todos os tipos. Só agora esses vastos recursos de informação começam a ser compilados de modo eficaz.

Francis S. Collins

J. Craig Venter

### O sequenciamento genômico é auxiliado por novas gerações de métodos de sequenciamento de DNA

As tecnologias de sequenciamento de DNA continuam a evoluir. Um genoma humano completo pode agora ser sequenciado em um ou dois dias, e um genoma bacteriano, em poucas horas. O dia em que a sequência genômica de um indivíduo se tornar parte rotineira do registro médico de uma pessoa está próximo (Quadro 9-2). Esses avanços se tornaram possíveis com métodos chamados de sequenciamento de última geração, ou “nextgen”. Às vezes, a estratégia de sequenciamento é semelhante ou bastante diferente da utilizada no método de Sanger descrito no Capítulo 8. As inovações permitiram uma miniaturização do procedimento, um grande aumento na escala e uma diminuição correspondente no custo.

Uma sequência genômica é gerada em várias etapas. Primeiro, as sequências genômicas são quebradas em locais aleatórios por cisalhamento para gerar fragmentos de algumas centenas de pares de bases de comprimento. Os oligonucleotídeos sintéticos são ligados às extremidades de todos os fragmentos, fornecendo um ponto de referência conhecido em cada molécula de DNA. Os fragmentos individuais são então imobilizados em uma superfície sólida, e cada um é amplificado utilizando-se a PCR (Figura 9-12). A superfície sólida é parte de um canal que permite que as soluções líquidas possam fluir sobre as amostras. O resultado é uma superfície sólida de apenas alguns centímetros, com milhões de grupamentos de DNA ligados, cada grupo contendo múltiplas cópias de uma única sequência de DNA derivada de um ou de outro fragmento de DNA genômico aleatório. A eficiência é decorrente do sequenciamento de todos esses milhões de grupamentos, ao mesmo tempo, com os dados de cada grupo capturados e armazenados em um computador.

Dois sequenciadores de última geração amplamente utilizados empregam diferentes estratégias para realizar as reações de sequenciamento. Um deles, o sequenciamento 454 (os números se referem a um código utilizado na fase de desenvolvimento da tecnologia e não têm significado científico), utiliza uma estratégia chamada de pirossequenciamento, na qual a adição de nucleotídeos é detectada com *flashes* de luz (**Figura 9-25**). Os quatro desoxinucleosídeos trifosfato (inalterados) são pulsados para a superfície de reação um de cada vez, em uma sequência de repetição. A solução de nucleotídeos fica retida na superfície apenas o tempo suficiente para que a DNA-polimerase possa adicionar esses nucleotídeos em qualquer grupo em que eles sejam complementares à próxima base-molde na sequência. O excesso de nucleotídeos é destruído rapidamente pela en-

## QUADRO 9-2  MEDICINA Medicina genômica personalizada

Os gêmeos californianos Noah e Alexis Beery nasceram com sintomas de paralisia cerebral. Os tratamentos não surtiram efeito. Insatisfeitos com o diagnóstico e o tratamento, os pais dos gêmeos, Joe e Retta, os levaram, com a idade de 5 anos, a um especialista em Michigan, que os diagnosticou com uma rara condição genética, chamada de distonia responsiva à DOPA. Um regime de tratamento suprimiu com sucesso os sintomas e permitiu que os gêmeos levassem uma vida normal. Entretanto, aos 12 anos, Alexis desenvolveu tosse severa e dificuldades para respirar que novamente pareciam ameaçar a vida da menina. Em um episódio, os paramédicos tiveram que reanimá-la duas vezes. Os sintomas não pareciam estar relacionados à distonia. Seria Noah o próximo? Frustrados e profundamente preocupados, os pais dos gêmeos procuraram o sequenciamento completo do genoma tanto de Noah quanto de Alexis. Essa decisão aparentemente incomum foi natural para a família Beery. Joe era o presidente da Life Technologies, desenvolvedores de tecnologias de sequenciamentos em uso por muitos grandes centros de sequenciamento de DNA. Os casos de Noah e Alexis foram assumidos por Matthew Bainbridge e sua equipe no Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center, em Houston, Texas. Os resultados mostraram-se decisivos. Os gêmeos apresentavam mutações em seus genomas que produziram não somente uma deficiência na DOPA, mas também uma deficiência potencial na produção do hormônio serotonina. Um pequeno ajuste na terapia de Alexis lhe proporcionou o fim dos sintomas que colocavam sua vida em risco, e o mesmo tratamento foi oferecido ao seu irmão. Os dois irmãos agora levam uma vida normal.

O primeiro projeto de sequenciamento do genoma humano foi concluído em 2001, após 12 anos, a um custo de US$ 3 bilhões. Esse custo caiu (Figura Q-1), e hoje genomas humanos completos são comuns. O objetivo de 1.000 dólares por genoma por pessoa está no horizonte e promete tornar essa tecnologia amplamente disponível. Como a maioria das alterações genômicas que afetam a saúde humana está em genes codificadores de proteínas (suposição que pode ser contestada nos próximos anos), uma alternativa mais barata é simplesmente sequenciar o 1% do genoma que representa as regiões codificadoras (éxons) de genes, ou o **exoma**.

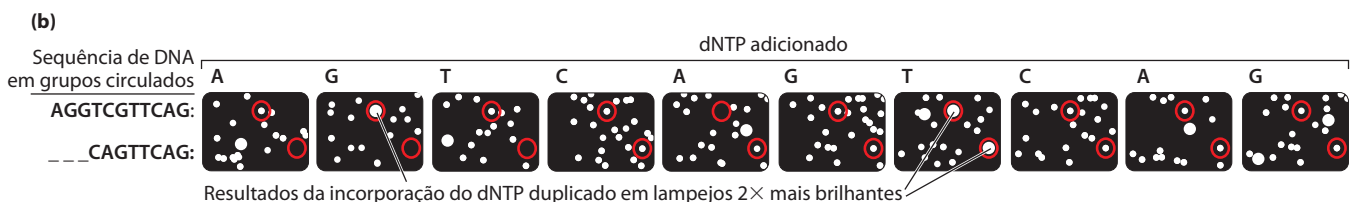
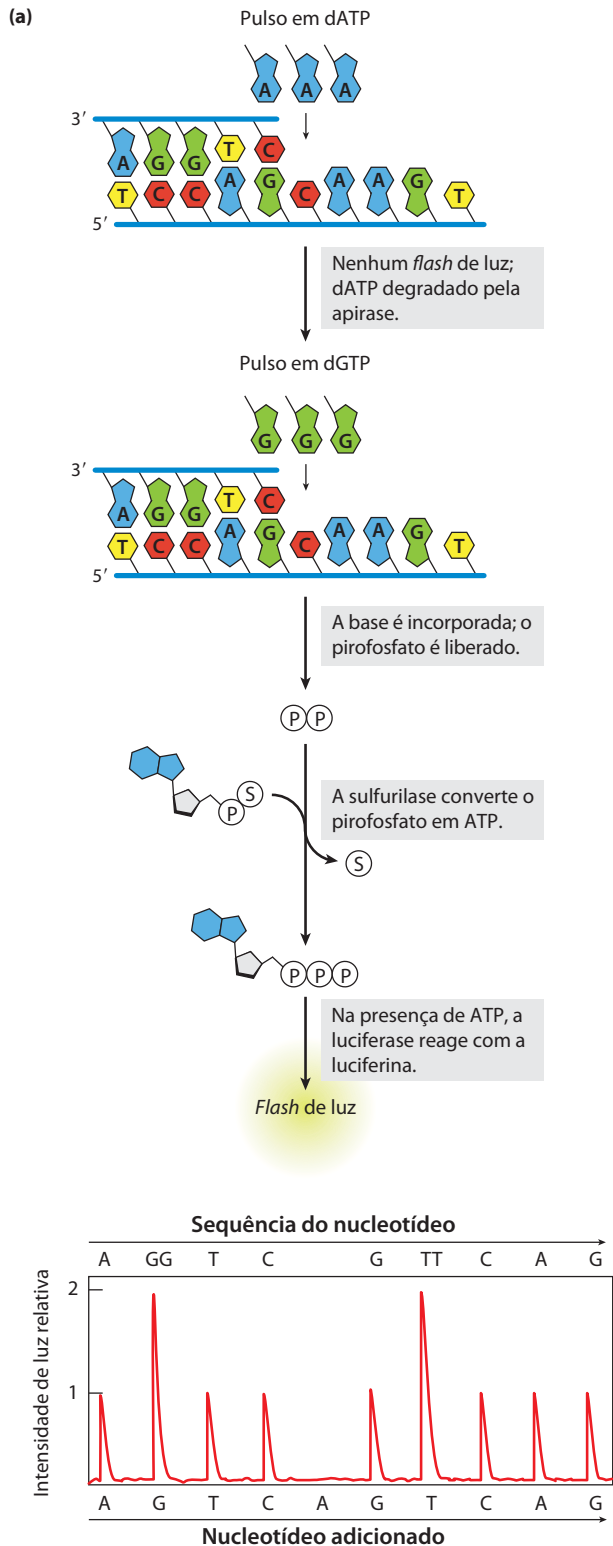
Essa primeira sequência do genoma humano veio de um genoma haploide, derivado de um amálgama de DNA de vários seres humanos diferentes. A conclusão de uma sequência de alta qualidade, em 2004, estabeleceu essa sequência como o genoma humano de referência. Sequências do genoma humano concluídas posteriormente, muitas de genomas diploides individuais, demonstraram o quanto existe de variação genética individual. Em relação à sequência de referência, um ser humano comum tem cerca de 3,5 milhões de SNP (cerca de 60% desses são heterozigotos, presentes apenas em um dos dois cromossomos) e algumas outras centenas de milhares de diferenças na forma de pequenas inserções e deleções e alterações no número de cópias repetidas. Apenas uma pequena porção (5.000 a 10.000) dos SNP afeta as sequências de aminoácidos das proteínas codificadas pelos genes.

**FIGURA Q-1** Desde janeiro de 2008, o custo do sequenciamento do genoma humano tem diminuído mais rápido do que o declínio projetado no custo do processamento de dados pelo computador (Lei de Moore).

Essa complexidade assegura que, pelo menos no curto prazo, o diagnóstico bem-sucedido de uma condição pelo sequenciamento de todo o genoma será uma exceção, e não a regra. Entretanto, poucas disciplinas avançam tão rapidamente quanto a genômica humana. O número de casos de sucesso aumenta rapidamente à medida que a tecnologia se torna mais amplamente disponível e se aprimora a capacidade das análises genômicas para reconhecer alterações genéticas causadoras de doenças.

---

zima apirase antes que o próximo nucleotídeo pulse. Quando um nucleotídeo específico é adicionado com sucesso às cadeias de um agrupamento, o pirofosfato é liberado como um supbroduto. Outra enzima na solução que banha a superfície é a sulfurilase, que converte o pirofosfato em ATP.

O aparecimento do ATP fornece por fim o sinal de que um nucleotídeo foi adicionado ao DNA. Também estão presentes no meio a enzima denominada luciferase e uma molécula do substrato, a luciferina (a luciferase é a enzima que gera o *flash* de luz produzido por vaga-lumes, ver Quadro 13-1). Quando o ATP é gerado, a luciferase catalisa uma reação com a luciferina que resulta em um pequeno *flash* de luz. Quando muitos *flashes* pequenos ocorrem em um grupo, a luz emitida pode ser gravada em uma imagem capturada. Por exemplo, quando o dCTP é adicionado à solução, os *flashes* irão ocorrer apenas nos grupos onde G está presente no molde e C é o próximo nucleotídeo a ser adicionado à cadeia de DNA em formação. Se houver uma fita de 2, 3 ou 4

resíduos G no molde, um número semelhante de resíduos C serão adicionados à fita em formação em um ciclo. Isso será registrado como uma amplitude de *flash* nesse grupo 2, 3 ou 4 vezes maior do que quando apenas um resíduo C é adicionado. Do mesmo modo, quando é adicionado dGTP, ocorrem *flashes* em um conjunto diferente de grupos, marcando-os como grupos em que G é o próximo nucleotídeo adicionado à sequência. O comprimento do DNA que pode ser sequenciado com confiança em um grupo único por esse método – muitas vezes chamado de comprimento lido ou "*read*" – normalmente é de 400 a 500 nucleotídeos, como no início de 2012, e está sendo constantemente aperfeiçoado.

O sequenciador Illumina é o método alternativo e utiliza uma técnica conhecida como sequenciamento de terminação reversível (**Figura 9-26**). Um oligonucleotídeo iniciador de sequenciamento especial é adicionado, que é complementar aos oligonucleotídeos de sequência conhecida que foram ligados às extremidades dos fragmentos de DNA em cada grupo (como descrito anteriormente). Além disso, nucleotídeos terminadores marcados com fluorescência e DNA-polimerase são adicionados. A polimerase adiciona o nucleotídeo adequado às fitas em cada grupo, cada tipo de nucleotídeo (A, T, G ou C) transportando um marcador fluorescente diferente. Esses nucleotídeos terminadores têm grupos de bloqueio ligados às estremidades 3′, permitindo apenas a adição de um nucleotídeo a cada fita. Em seguida, raios lasers excitam todos os marcadores fluorescentes, e uma imagem de toda a superfície revela a cor (e, portanto, a identidade da base) adicionada a cada grupo. O marcador fluorescente e os grupos de bloqueio são então removidos química ou fotoliticamente, em preparação para a adição de um novo nucleotídeo para cada grupo. Os procedimentos de sequenciamento são realizados em etapas. Os comprimentos lidos são mais curtos para esse método, normalmente de 100 a 200 nucleotídeos por grupo.

Essas tecnologias são manifestações modernas de um método de sequenciamento genômico às vezes chamado de sequenciamento *shotgun*. Muitas cópias do DNA genômico

**FIGURA 9-25 Pirossequenciamento de última geração. (a)** O pirossequenciamento utiliza as enzimas sulfurilase (ver Figura 22-15) e luciferase (ver Quadro 13-1) para detectar a adição de nucleotídeos com *flashes* de luz. O gráfico mostra as intensidades de luz observadas durante ciclos sucessivos de sequenciamento para um segmento de DNA imobilizado em um ponto específico de uma placa de microtitulação e (no topo) a sequência de nucleotídeos do DNA derivada deles. **(b)** Uma imagem de uma parte muito pequena de um ciclo do sequenciamento 454. Cada segmento individual de DNA a ser sequenciado é ligado a um microgrânulo de captura de DNA, em seguida amplificado no grânulo por PCR. Cada grânulo é imerso em uma emulsão e colocado em um micropoço (~29 $\mu$m) em uma placa de microtitulação. A reação de luciferina e do ATP com a luciferase produz *flashes* de luz quando um nucleotídeo é adicionado a um grupo de DNA específico em um determinado poço. Os círculos representam o mesmo grupo após múltiplos ciclos. Nesse caso, a leitura do ciclo de cima (ou de baixo) da esquerda para a direita ao longo de cada seta fornece a sequência para esse grupo.

(c)

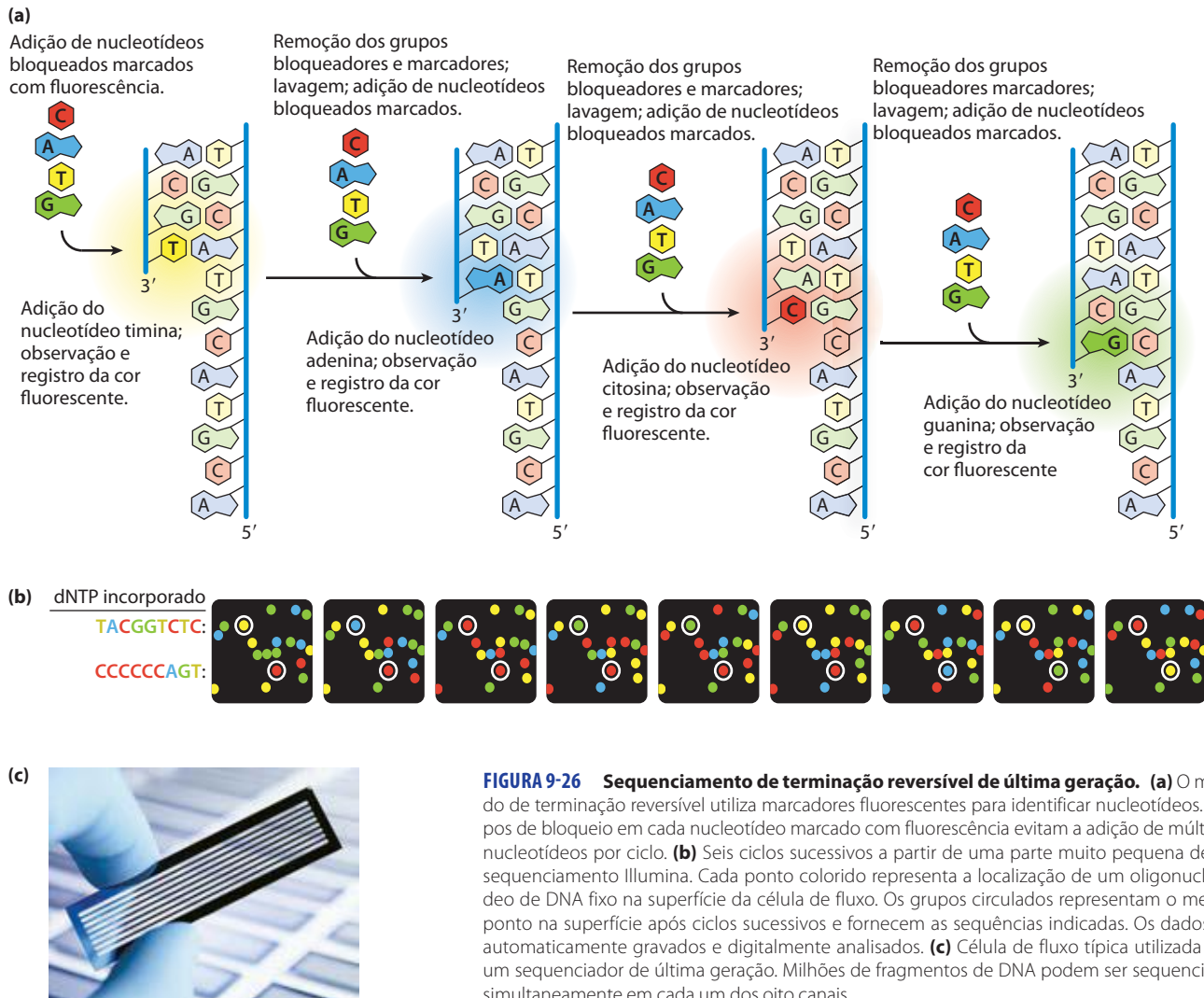



**FIGURA 9-26 Sequenciamento de terminação reversível de última geração. (a)** O método de terminação reversível utiliza marcadores fluorescentes para identificar nucleotídeos. Grupos de bloqueio em cada nucleotídeo marcado com fluorescência evitam a adição de múltiplos nucleotídeos por ciclo. **(b)** Seis ciclos sucessivos a partir de uma parte muito pequena de um sequenciamento Illumina. Cada ponto colorido representa a localização de um oligonucleotídeo de DNA fixo na superfície da célula de fluxo. Os grupos circulados representam o mesmo ponto na superfície após ciclos sucessivos e fornecem as sequências indicadas. Os dados são automaticamente gravados e digitalmente analisados. **(c)** Célula de fluxo típica utilizada para um sequenciador de última geração. Milhões de fragmentos de DNA podem ser sequenciados simultaneamente em cada um dos oito canais.

são cortadas para gerar cada conjunto de fragmentos. Assim, um determinado segmento curto do genoma pode estar presente em dezenas ou mesmo centenas de diferentes grupos sequenciados. Entretanto, não há qualquer marcação sobre um fragmento individual para revelar a procedência do genoma. Traduzir as sequências desses milhões de fragmentos em uma sequência genômica requer o alinhamento computadorizado de sequências de fragmentos que se sobrepõem (**Figura 9-27**). As sobreposições permitem rastrear a sequência ao longo de um cromossomo no computador, de um fragmento para outro. Isso permite a montagem de sequências contíguas chamadas de **contigs**. Em um exercício de sequenciamento genômico bem-sucedido, muitos contigs podem se estender por milhões de pares de bases. São necessárias estratégias especiais para preencher as lacunas inevitáveis e para lidar com as sequências repetitivas.

## O genoma humano contém genes e muitos outros tipos de sequências

Métodos novos e mais eficientes para o sequenciamento de DNA produziram uma explosão de novas sequências genômicas. Elas são armazenadas e disponibilizadas em vários bancos de dados acessíveis publicamente. Uma boa abordagem para esses recursos pode ser encontrada no National Center for Biotechnology Information (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov). A análise dessa riqueza crescente de informações genômicas está em curso. O que revela o genoma humano e sua comparação com o de outros organismos?

Em alguns aspectos, o ser humano não é tão complicado como se imaginava. A estimativa de décadas atrás de que os seres humanos tivessem cerca de 100.000 genes nos aproximadamente $3{,}2 \times 10^9$ pares de bases do genoma humano foi suplantada pela descoberta de que existem apenas cerca de 25.000 genes codificadores de proteínas – menos do que o dobro do número em uma mosca-das-frutas (13,6 mil), não muito mais do que em um nematódeo (20.000) e menos do que em uma planta de arroz (38.000).

Em outros aspectos, entretanto, o ser humano é mais complexo do que se pensava anteriormente. O estudo da estrutura dos cromossomos eucarióticos e das sequências do genoma revelou que muitos, se não a maioria dos genes eucarióticos, contêm um ou mais segmentos de DNA intervenientes que não codificam a sequência de aminoá-

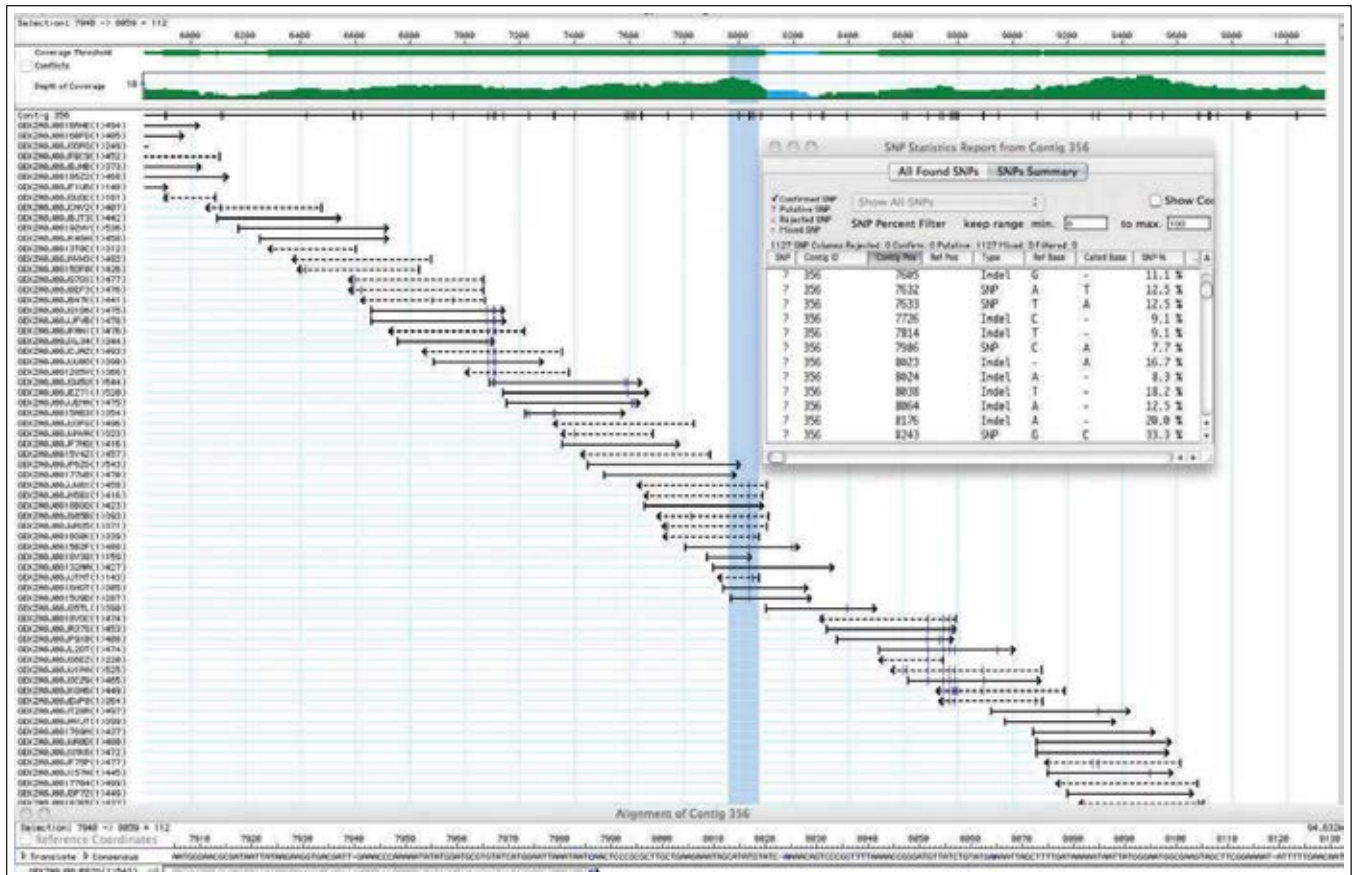



**FIGURA 9-27 Montagem da sequência.** Em uma sequência genômica, cada par de bases do genoma costuma ser representado em vários, frequentemente dezenas, dos fragmentos sequenciados, chamados de *reads*. É mostrada uma pequena parte da sequência de uma nova variante de espécie de *E. coli*, com os *reads* gerados por um sequenciador 454. Os números no topo representam as posições dos pares de bases genômicos, em relação a um "0" definido arbitrariamente. Todas as sequências são provenientes de um contig longo denominado 356. Os *reads* são representados por setas horizontais, com identificadores atribuídos por computador listados para cada um à esquerda. Segmentos de fita de DNA são sequenciados aleatoriamente, com sequências obtidas de uma fita (5′→3′, da esquerda para a direita) representadas por setas sólidas e sequências obtidas de outra fita (5′→3′, da direita para a esquerda) representadas por linhas pontilhadas. As últimas sequências são automaticamente relatadas como seus complementos quando são fundidas com o conjunto de dados em geral. O limiar de cobertura na parte superior é uma medida da qualidade da sequência. A barra verde maior indica as sequências que foram obtidas em número de vezes suficientes para gerar alta fidelidade nos resultados. A profundidade da linha de cobertura indica quantas vezes um determinado par de bases aparece em um *read* sequenciado. A barra azul vertical denota uma parte da sequência destacada na linha de sequência na parte inferior da figura. O relatório estatístico de SNP (no detalhe) é uma lista de posições onde polimorfismos de nucleotídeos únicos parecem estar presentes em alguns dos *reads*. Esses supostos SNP são muitas vezes verificados por sequenciamento adicional. Eles são indicados nos *reads* por marcas verticais finas azuis nas linhas horizontais de cada *read*.

cidos do produto polipeptídico. Essas inserções não traduzidas interrompem, por outro lado, a relação colinear entre a sequência de nucleotídeos do gene e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo codificado. Esses segmentos de DNA não traduzidos são chamados de **sequências intervenientes** ou **íntrons**, e os segmentos codificadores são chamados de **éxons** (**Figura 9-28**). Poucos genes bacterianos contêm íntrons. Os íntrons são removidos do transcrito de RNA primário e os éxons são unidos para gerar um transcrito que pode ser traduzido juntamente em um produto proteico (ver Capítulo 26). Um éxon muitas vezes (mas nem sempre) codifica um único domínio de uma proteína maior com vários domínios. Modos alternativos de expressão gênica e *splicing* do RNA permitem a produção de várias combinações de éxons, que levam à produção de mais de uma proteína a partir de um único gene. Os seres humanos compartilham muitos tipos de domínios de pro-

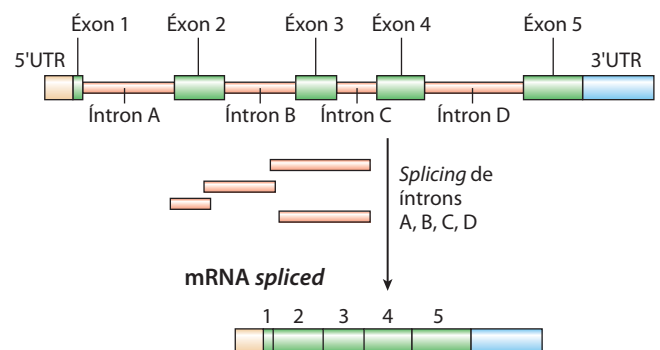



**FIGURA 9-28 Íntrons e éxons.** Esse transcrito de gene contém cinco éxons e quatro íntrons, ao longo das regiões 5′e 3′ não traduzidas (5′URT e 3′URT). O *splicing* remove os íntrons para criar um produto de mRNA para a tradução na proteína.

teínas com plantas, vermes e moscas, mas esses domínios são utilizados em arranjos mais complexos, gerando, assim, proteínas mais complexas.

Nos mamíferos e em alguns outros eucariotos, um gene normal tem uma proporção muito maior de DNA íntron do que DNA éxon; na maioria dos casos, a função dos íntrons não é clara. Apenas cerca de 1,5% do DNA humano é "codificador" ou DNA éxon, transportando informação para os produtos proteicos (**Figura 9-29a**). Entretanto, quando os íntrons muito maiores são incluídos na contagem, cerca de 30% do genoma humano consiste nesses genes. Vários esforços estão em curso para categorizar os genes codificadores de proteínas por função (Figura 9-29b).

A relativa escassez de genes no genoma humano deixa uma grande quantidade de DNA inexplicado. Grande parte do DNA no gene está na forma de sequências repetidas de vários tipos. Talvez o mais surpreendente seja que cerca de metade do genoma humano é constituída por sequências moderadamente repetidas derivadas de elementos transponíveis – segmentos de DNA que vão de algumas centenas a vários milhares de pares de bases de comprimento, que podem se mover de um local para outro no genoma. Originalmente descobertos no milho por Barbara McClintock, os elementos transponíveis, ou **transposons**, são uma espécie de parasita molecular. Eles fazem sua casa nos genomas de essencialmente todos os organismos de modo eficiente e em grande parte passivo. Muitos transposons contêm genes que codificam proteínas que catalisam o próprio processo de transposição, como detalhado nos Capítulos 25 e 26. Existem múltiplas classes de transposons no genoma humano. Alguns são ativos, movendo-se em frequência baixa, mas a maioria é inativo, relíquias evolutivas alteradas por mutações.

**FIGURA 9-29 Panorama do genoma humano. (a)** Este gráfico setorial mostra as proporções de vários tipos de sequências no genoma humano. Os transposons, incluindos os SINE e LINE, são descritos nos Capítulo 25 e 26. **(b)** Os aproximadamente 25.000 genes codificadores de proteínas no genoma humano podem ser classificados pelo tipo de proteína que codificam.

Uma vez que os genes codificadores de proteínas (incluindo éxons e íntrons) e transposons sejam levados em conta, talvez restem cerca de 25% do DNA total. A maior parcela disso consiste em sequências únicas encontradas entre genes codificadores de proteínas. Como descrito no Capítulo 26, praticamente todos esses segmentos de DNA são transcritos em RNA em pelo menos algumas células humanas. Novas classes de RNA funcionais – codificadas por genes cuja existência era previamente insuspeita – estão sendo descobertas em um ritmo acelerado. Muitos genes codificadores de RNA funcionais são difíceis de identificar pelos métodos automatizados, em particular quando os produtos de RNA não foram caracterizados. Entretanto, os genes codificadores de RNA são claramente uma característica marcante dessas regiões genômicas, que de outro modo, seriam desconhecidas.

Outros 3% ou menos do genoma humano são compostos de sequências altamente repetitivas chamadas de **repetições de sequências simples** (**SSR**). Geralmente com menos de 10 pb de comprimento, uma SSR é algumas vezes repetida milhões de vezes por célula e tem uma importância funcional identificável no metabolismo de células humanas. Os exemplos mais importantes de DNA SSR ocorrem em centrômeros e telômeros (ver Capítulo 24). Entretanto, repetições longas de sequências simples também ocorrem por todo o genoma.

O que todas essas informações nos revelam sobre as semelhanças e diferenças entre os seres humanos individuais? Dentro da população humana há milhões de variações de base única, chamadas de **polimorfismos de nucleotídeo único**, **ou SNP** (pronuncia-se "snips"). Cada ser humano difere do próximo, em média, em 1 em cada 1.000 pb. Muitas dessas variações estão na forma de SNP, mas também ocorre uma grande variedade de deleções maiores, inserções e pequenos rearranjos na população humana. A partir dessas diferenças genéticas, muitas vezes sutis, surgem as variações humanas perceptíveis – diferenças na cor do cabelo, estatura, visão, alergias, tamanho do pé e (até certo grau desconhecido) comportamento.

O processo de recombinação genética e a segregação cromossômica durante a meiose tendem a misturar e combinar essas pequenas variações genéticas para que diferentes combinações de genes sejam herdadas (ver Capítulo 25). Quando duas dessas variações genéticas estão em cromossomos diferentes, as variantes específicas que possam ser herdadas por um determinado indivíduo são o resultado do acaso. Se as variantes genéticas estão no mesmo cromossomo, a chance delas serem herdadas em conjunto é uma função inversa da distância entre elas. Grupos de SNP e outras diferenças genéticas próximas no mesmo cromossomo são raramente afetados por recombinação e costumam ser herdados juntos; esses grupos são conhecidos como **haplótipos**. Os haplótipos fornecem marcadores

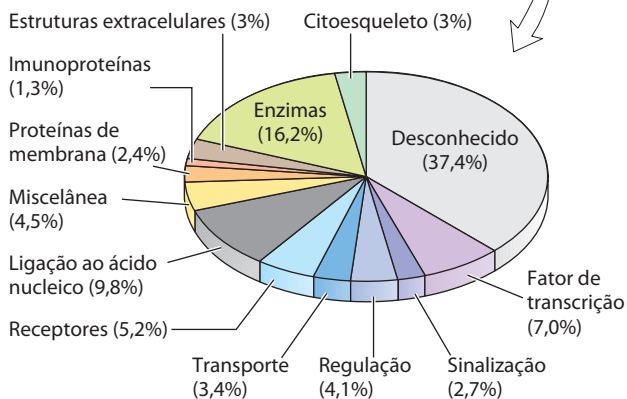



**FIGURA 9-30 Identificação de haplótipos.** **(a)** Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), ou posições no genoma humano onde as sequências variam de um indivíduo para outro, são identificadas em amostras genômicas e **(b)** grupos de SNP relativamente próximos uns dos outros em um cromossomo (dentro de algumas dezenas de milhares de pares de bases) são compilados em um haplótipo. Os SNP irão variar na população em geral, assim como nos quatro indivíduos fictícios mostrados nos painéis (a) e (b). Entretanto, os SNP escolhidos para definir um haplótipo são frequentemente os mesmos na maioria dos indivíduos de uma determinada população. **(c)** SNP definidores de haplótipos (SNP marcadores) podem ser utilizados para simplificar o processo de identificação de um haplótipo de um indivíduo (sequenciando 3 SNP definidores, em vez de todos os 20). Se os SNP marcadores mostrados em vermelho claro forem sequenciados, os nucleotídeos A, T e G nas três posições sucessivas do SNP marcador poderiam ser característicos de uma população nativa de um local no norte da Europa, enquanto os nucleotídeos G, T e C nessas três mesmas posições genômicas poderiam ser encontrados em uma população da Ásia. Múltiplos haplótipos deste tipo são utilizados para rastrear migrações humanas pré-históricas (ver Figura 9-35).

convenientes para algumas populações humanas e indivíduos dentro das populações.

Para definir um haplótipo são necessárias várias etapas. Em primeiro lugar, as posições que contêm SNP na população humana são identificadas em amostras de DNA genômico a partir de múltiplos indivíduos (**Figura 9-30a**). Cada SNP pode ser separado do seguinte por muitos milhares de pares de bases. Em segundo lugar, os SNP relativamente próximos em um cromossomo e, portanto, geralmente herdados juntos, são compilados em haplótipos (Figura 9-30b). Cada haplótipo consiste nas bases específicas encontradas nas várias posições do SNP no haplótipo definido. Finalmente, SNP marcadores – um subconjunto de SNP que define todo o haplótipo – são escolhidos para identificar cada haplótipo individualmente (Figura 9-30c). Por meio do sequenciamento de apenas essas posições marcadoras em amostras genômicas de populações humanas, os pesquisadores rapidamente identificam quais haplótipos estão presentes em cada indivíduo. Haplótipos especialmente estáveis existem no genoma mitocondrial (que, sendo herdados pela mãe, nunca sofrem recombinação meiótica) e no cromossomo Y masculino (apenas 3% dos quais são homólogos ao cromossomo X e, portanto, sujeitos a recombinação).

## O sequenciamento do genoma dá informações sobre a humanidade

A finalidade principal da maioria dos projetos de sequenciamento do genoma é identificar elementos genéticos conservados de significado funcional, como as sequências conservadas dos éxons, regiões reguladoras e outras características genômicas, como centrômeros e telômeros. Um dos principais objetivos do sequenciamento do genoma humano é a identificação das diferenças entre o genoma humano e dos outros organismos. Embora o genoma humano esteja intimamente relacionado a genomas de outros mamíferos em amplos segmentos de cada cromossomo, as diferenças de uns poucos porcentuais em bilhões de pares de bases adicionam milhões de distinções genéticas. A pesquisa sobre essas diferenças utilizando técnicas genômicas comparativas revela a base molecular de doenças genéticas humanas e ajuda a identificar genes, alterações gênicas e outras características genômicas exclusivamente humanas e, assim, contribuir para definir características humanas como cérebro grande, habilidades linguísticas, a capacidade de produzir ferramentas ou o bipedalismo.

As sequências do genoma de parentes biológicos mais próximos, os chimpanzés e bonobos, oferecem algumas pistas importantes e ilustram o processo comparativo. Os seres humanos e os chimpanzés compartilharam um ancestral comum cerca de 7 milhões de anos atrás. As diferenças genômicas entre as duas espécies são de dois tipos: mudanças de pares de base (SNP) e rearranjos genômicos maiores de muitos tipos. Os SNP em regiões codificadoras de proteínas com frequência resultam em mudanças nos aminoácidos que podem ser utilizadas para construir uma árvore filogenética (**Figura 9-31a**). Os segmentos de cromossomos podem se inverter ao longo do processo evolutivo. Os processos que levam a tais inversões são complicados e raros, mas a linhagem humana tem segmentos longos de DNA invertidos (em relação a outros primatas) em função de processos nos cromossomos 1, 12, 15, 16 e 18. Fusões cromossômicas também podem ocorrer. Na linhagem humana, dois cromossomos encontrados em outras linhagens de primatas se fusionaram para formar o único cromossomo 2 humano (Figura 9-31b).

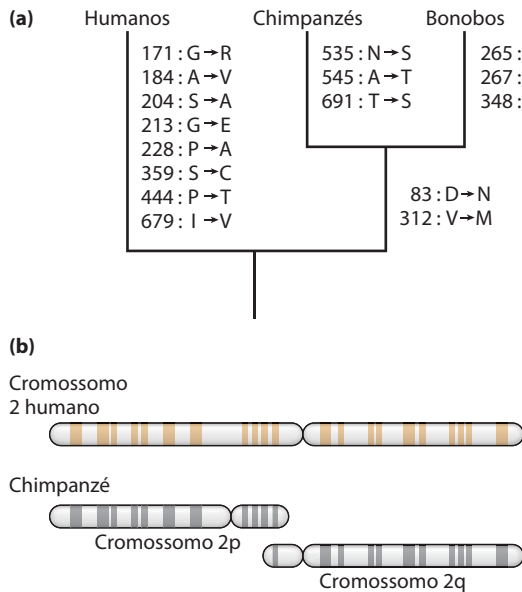



**FIGURA 9-31 Alterações genômicas na linhagem humana. (a)** Esta árvore evolutiva para primatas é derivada de sequências para o receptor de progesterona, que ajudam a regular muitos eventos na reprodução. O gene que codifica essa proteína sofreu mais alterações evolutivas do que a maioria. Mudanças nos aminoácidos associadas unicamente a humanos, chimpanzés e bonobos são listadas pelo número de resíduos ao lado de cada ramo. **(b)** Os genes nos cromossomos de chimpanzés 2p e 2q são homólogos àqueles no cromossomo 2 humano, indicando que, em algum ponto na linhagem que leva aos humanos, os dois cromossomos se fusionaram em um.

Assim, a linhagem humana tem 23 pares de cromossomos em vez dos 24 pares normais em outros primatas. Quando essa fusão apareceu na linha que conduz aos seres humanos, ela representou uma grande barreira para o cruzamento com outros primatas que não a apresentavam.

Sem considerar os transposons e os grandes rearranjos cromossômicos, os genomas humanos e de chimpanzés publicados diferem em apenas 1,23% no nível de pares de bases (em comparação com a variação de 0,1% de um ser humano para outro). Sem considerar mais variações nas posições onde existe um polimorfismo conhecido tanto na população humana quanto na de chimpanzés (essas pouco provavelmente refletem uma mudança evolutiva que define uma nova espécie), as diferenças aumentam para cerca de 1,06%, ou cerca de 1 em cada 100 pb. Essa pequena porcentagem se traduz em mais de 30 milhões de mudanças de pares de base, algumas das quais afetam a função de proteínas e a regulação gênica. Os rearranjos genômicos que ajudam a distinguir os chimpanzés e os seres humanos incluem 5 milhões de inserções curtas ou deleções envolvendo alguns pares de bases cada, bem como um número substancial de inserções maiores, deleções, inversões ou duplicações que podem envolver muitos milhares de pares de bases. Quando inserções de transposons – importante fonte de variação genômica – são incluídas, as diferenças entre os genomas humano e de chimpanzé aumentam para cerca de 90 milhões de pb, representando outros 3% desses genomas. Com efeito, cada espécie tem segmentos de DNA, constituindo 40 a 45 milhões de pb totalmente exclusivos para esse genoma particular, com inserções cromossômicas maiores, duplicações e outros rearranjos que afetam mais pares de bases do que fazem as mudanças de nucleotídeo único. Portanto, as diferenças genômicas totais entre chimpanzés e humanos equivalem a cerca de 4% de seus genomas.

Classificar as diferenças genômicas relevantes para características exclusivamente humanas é uma tarefa desencorajadora. Se as duas espécies compartilham um ancestral comum, então, assumindo uma taxa de evolução semelhante em ambas as linhagens, metade das mudanças representa mudanças na linhagem dos chimpanzés e a outra metade alterações na linhagem humana. Quando se observa uma diferença, como descrever qual variante era aquela presente no ancestral comum? Uma maneira é comparar ambas as sequências do genoma com as de organismos relacionados mais distantemente, chamados de **grupos externos**. Considere um *locus* X, onde existe uma diferença entre o genoma humano e o do chimpanzé (**Figura 9-32**). A linhagem do orangotango, um grupo externo, divergiu da de chimpanzés e humanos antes do ancestral comum chimpanzé-humano. Se a sequência no *locus* X é idêntica em orangotangos e chimpanzés, essa sequência estava provavelmente presente no ancestral chimpanzé-humano, e a sequência observada em humanos é específica para a linhagem humana. As sequências idênticas em seres humanos e nos orangotangos podem ser eliminadas como candidatas para características genômicas humanas específicas. A importância de comparações com grupos externos intimamente relacionados originou novos esforços para sequenciar o genoma de orangotangos, macacos e muitas outras espécies de primatas.

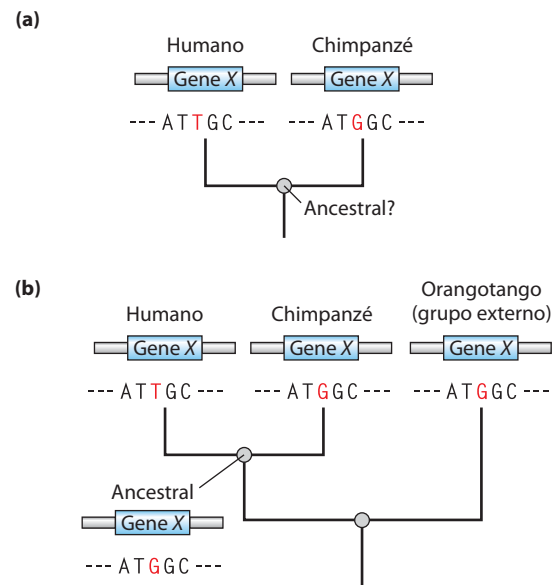



**FIGURA 9-32 Determinação das alterações de sequências únicas para uma linhagem ancestral. (a)** São comparadas as sequências do mesmo gene hipotético em humanos e chimpanzés. A sequência deste gene em seu último ancestral comum é desconhecida. **(b)** O genoma do orangotango é utilizado como um grupo externo. A sequência do gene do orangotango é idêntica à do gene do chimpanzé. Isso significa que a mutação que leva a diferenças entre humanos e chimpanzés quase certamente ocorreu na linhagem que conduziu aos humanos modernos, e o ancestral comum de humanos e chimpanzés (e orangotangos) tinha a sequência agora encontrada em chimpanzés.

A busca pelas bases genéticas de características humanas especiais, tais como a função cerebral avançada, beneficia-se de duas abordagens complementares. As primeiras pesquisas de regiões genômicas mostram alterações extremas a partir de outros primatas. Essas incluem várias duplicações de genes ou a adição de segmentos genômicos grandes não presentes em outros primatas. A segunda abordagem analisa genes conhecidos envolvidos em condições humanas relevantes. Para a função cerebral, por exemplo, pode-se examinar genes que, quando mutados, contribuem para os transtornos cognitivos ou outros distúrbios mentais.

Notavelmente, as análises da linhagem humana ainda não detectaram um enriquecimento de modificações genéticas nos genes que codificam proteínas envolvidas no desenvolvimento ou no tamanho cerebral. Em primatas, a maioria dos genes que funcionam exclusivamente no cérebro é ainda mais altamente conservada do que os genes que funcionam em outros tecidos. Entretanto, algumas diferenças na expressão gênica são observadas. Quando as mudanças em regiões genômicas relacionadas à regulação gênica são analisadas, os genes envolvidos no desenvolvimento neural e nutrição são desproporcionalmente afetados. Diversos genes codificadores de RNA, alguns com expressão concentrada no cérebro, também mostram evidências de evolução acelerada (**Figura 9-33**). As muitas novas classes de RNA que estão sendo descobertas (ver Capítulo 26) provavelmente irão mudar radicalmente a perspectiva sobre como a evolução altera o funcionamento dos sistemas de seres vivos. É cada vez mais evidente que os genes expressos talvez não sejam tão importantes como quando, onde e quanto deles é expresso.

## Comparações do genoma ajudam a localizar genes envolvidos em doenças

O Projeto Genoma Humano tem cumprido o seu potencial para acelerar a descoberta de genes subjacentes a doenças genéticas: mais de 1.600 doenças genéticas humanas já tiveram seus genes específicos mapeados. Com o uso de um método denominado **análise de ligação**, o gene envolvido em uma doença é mapeado em relação aos polimorfismos genéticos bem caracterizados que ocorrem em todo o genoma humano. A busca muitas vezes começa com uma ou mais famílias grandes que incluam vários indivíduos afetados por determinada doença ao longo de várias gerações. A abordagem mais comum é basicamente um exercício de filogenética (o estudo de parentesco evolutivo entre grupos de organismos) e está profundamente enraizada em conceitos derivados da biologia evolutiva. É possível ilustrar descrevendo a busca de um gene envolvido na doença de Alzheimer. Cerca de 10% de todos os casos dessa doença nos Estados Unidos resultam de uma predisposição hereditária. Vários genes diferentes que foram descobertos, quando mutados, podem levar ao aparecimento precoce da doença de Alzheimer. Um desses genes (*PS1*) codifica a proteína presenilina-1 e para sua descoberta a análise de ligação foi muito utilizada.

Assim como os haplótipos dependem dos SNP que se encontram juntos em um cromossomo, a análise de ligação envolve a busca dos SNP que se encontram próximos do gene de interesse. Nesse tipo de estudo, os pesquisadores se concentram nas famílias afetadas pela doença, e procuram famílias nas quais as amostras de DNA podem ser obtidas a partir de indivíduos de várias gerações. As amostras de DNA são coletadas tanto dos membros da família afetados quanto dos não afetados. Em primeiro lugar, os pesquisadores localizam a região associada à doença em um cromossomo específico, utilizando conjuntos (chamados painéis) de localizações genômicas onde SNP comuns ou outras alterações genômicas mapeadas ocorrem em uma proporção significativa da população humana. Assim, muitos, mas não todos os humanos diferem na sequência genômica nesses locais. Utilizando um painel que inclua vários *loci* SNP bem caracterizados mapeados para cada cromossomo, os investigadores comparam os genótipos de indivíduos com e sem a doença, se concentrando principalmente nos familiares próximos. Para a doença de Alzheimer, duas das muitas linhagens familiares utilizadas para procurar esse gene no início da década de 1990 são mostradas na **Figura 9-34**. Utilizando essas linhagens, os investigadores descobriram variantes SNP específicas herdadas no mesmo ou quase no mesmo padrão que o gene causador da doença. O gene responsável pode gradualmente ser localizado em um único cromossomo, se a herança das variantes específicas de SNP no cromossomo se refletir perto da herança da condição da doença. Uma localização mais detalhada de um gene em um cromossomo causador de doença se baseia em métodos estatísticos para correlacionar a herança de polimorfismos adicionais mais próximos no espaço com a ocorrência da doença, se concentrando sobre um painel mais denso de polimorfismos que se sabe que ocorre no cromossomo de interesse. Quanto mais próximo um marcador está localizado do gene de uma doença, maior a probabilidade dele ter sido herdado junto com esse gene. Esse processo pode indicar uma

**FIGURA 9-33 Evolução acelerada em alguns genes humanos.** O *locus* HAR1F especifica um RNA não codificador que é altamente conservado em vertebrados. Em humanos, o gene HAR1F exibe um número incomum de mutações (vermelho-claro sombreado), fornecendo evidência de evolução acelerada.

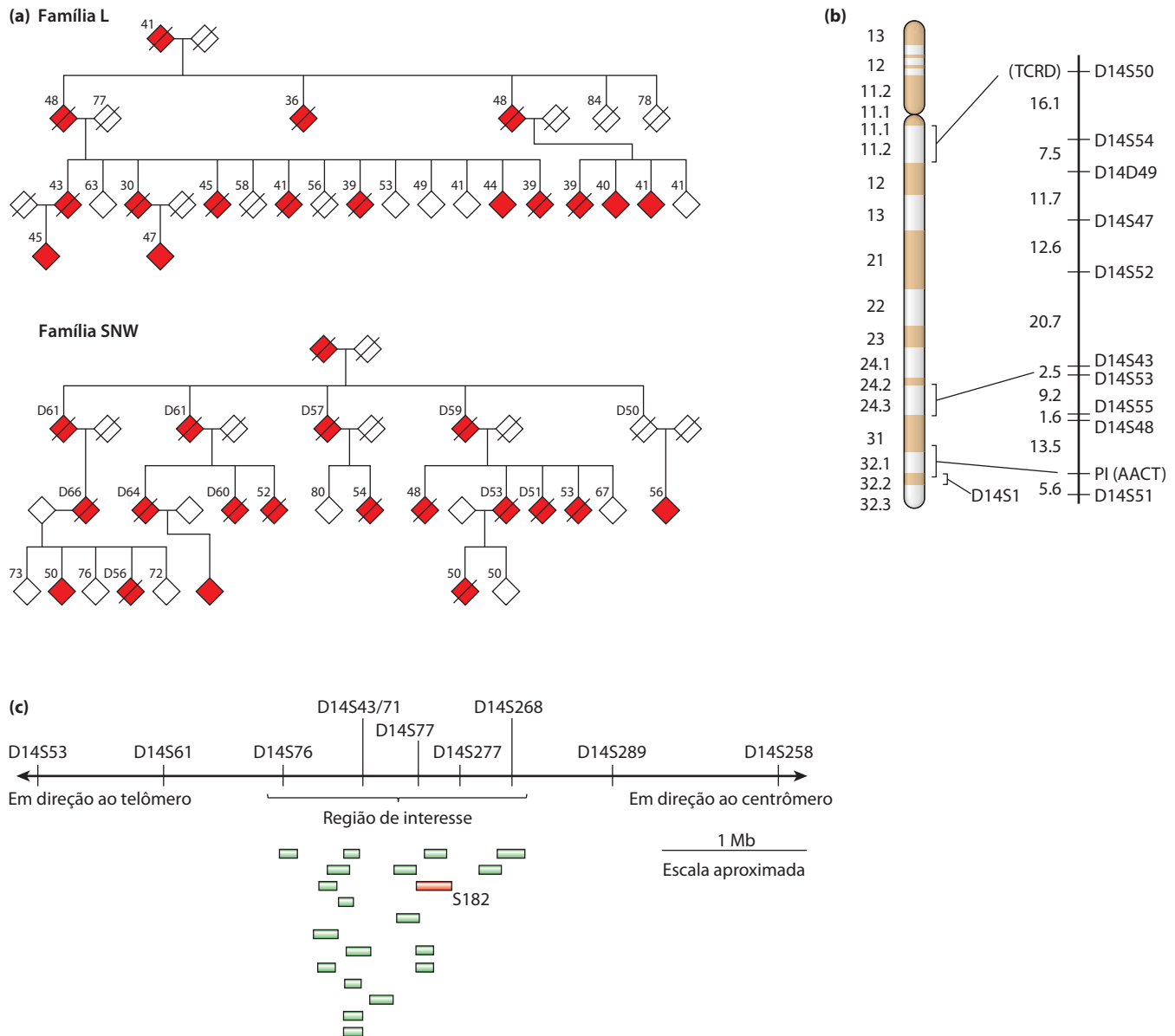



**FIGURA 9-34 Análise de ligação na descoberta de genes de doenças.** **(a)** Estes heredogramas para duas famílias afetadas pelo início precoce da doença de Alzheimer se baseiam nos dados disponíveis no momento do estudo. Os símbolos vermelhos representam os indivíduos afetados; as barras indicam as mortes antes ou logo no início do estudo. O número acima de cada símbolo corresponde à idade da pessoa, tanto no tempo do estudo quanto no momento da morte (indicada com a letra D). Para proteger a privacidade da família, o gênero não é indicado. **(b)** Cromossomo 14, com bandas criadas por alguns corantes. As posições dos marcadores de cromossomos são mostradas à direita, com a distância genética entre eles apresentada em uma medida de distância genética chamada de centimorgans, refletindo a frequência de recombinação entre eles. O *TCRD* (receptor delta de célula T) e *PI* (AACT [$\alpha$1-antiquimotripsina]) são genes com alterações na população humana que foram utilizados como marcadores, juntamente com os SNP, no mapeamento de cromossomos. **(c)** A partir da comparação do DNA dos membros de famílias afetadas e não afetadas, uma região de interesse que contém 19 genes expressos foi finalmente definida próxima do marcador D14S43. O gene marcado *S182* (em vermelho) codifica a presenilina-1.

região do cromossomo que contém o gene. No exemplo da doença de Alzheimer, a análise de ligação indicou que o gene causador da doença estava em algum lugar próximo a um *locus* de SNP chamado D14S43 (Figura 9-34c).

As etapas finais da pesquisa para o gene da doença utilizam novamente o banco de dados do genoma humano. A região local que contém o gene é examinada e os seus genes são identificados. O DNA de muitos indivíduos, alguns com a doença e outros sem a doença, é sequenciado nessa região. Com o número crescente de indivíduos analisados, esse processo gradual leva à identificação das variantes genéticas consistentemente presentes em indivíduos com a doença e ausentes em indivíduos não afetados. A pesquisa pode ser auxiliada por uma compreensão da função dos genes na região-alvo, porque vias metabólicas específicas podem ser mais propensas a produzir a doença do que outras. Em 1995, o gene no cromossomo 14 associado à doença de Alzheimer foi identificado como o gene *S182*. O produto desse gene foi denominado de presenilina-1, e o próprio gene depois foi renomeado para *PS1*.

Mais complexos são os casos em que a doença é causada pela presença de mutações em dois genes diferentes (nenhum dos quais, isoladamente, é capaz de causar a doença), ou quando uma condição específica é potencializada por uma mutação, de outra maneira inócua, em outro gene. A identificação dos genes e mutações responsáveis por essas doenças digênicas é extremamente difícil e essas doenças, algumas vezes, só são possíveis de serem documentadas dentro de populações pequenas, isoladas e altamente puras.

Os bancos de dados do genoma abrem caminhos alternativos para a identificação de genes de doenças, especialmente quando a informação bioquímica sobre a doença é conhecida. No caso da doença de Alzheimer, um acúmulo de proteína $\beta$ amiloide no sistema límbico e nos córtices de associação do cérebro é, pelo menos parcialmente, responsável pelos sintomas. Defeitos na presenilina-1 (e em uma proteína relacionada, a presenilina-2, codificada por um gene no cromossomo 1) conduzem a níveis corticais elevados de proteína $\beta$ amiloide. Bancos de dados se concentram em catalogar tal informação funcional sobre os produtos proteicos de genes e nas redes de interação de proteínas, localização de SNP e outros dados, proporcionando um caminho rápido para a identificação de genes candidatos a determinada doença. Um pesquisador com certo conhecimento sobre os tipos de enzimas ou outras proteínas que contribuem para a doença pode utilizar esses bancos de dados para gerar uma lista de genes conhecidos que codificam proteínas com funções relevantes, genes adicionais não caracterizados com relações de ortólogos ou parálogos aos genes nesta lista, uma lista de proteínas conhecidas que interagem com as proteínas-alvo ou ortólogos em outros organismos e um mapa de posições de genes. Com os dados de linhagens de famílias selecionadas, uma pequena lista de genes potencialmente relevantes pode muitas vezes ser rapidamente determinada.

Essas abordagens não se limitam a doenças humanas. Os mesmos métodos podem ser utilizados para identificar os genes envolvidos em doenças – ou genes que produzem características desejáveis – em outros animais e plantas. ■

## Sequências no genoma informam sobre o passado humano e fornecem oportunidades para o futuro

Cerca de 70.000 anos atrás, um pequeno grupo de seres humanos na África atravessou o Mar Vermelho em direção à Ásia. Talvez incentivados por alguma inovação na construção de pequenos barcos, ou conduzidos por conflitos ou fome, ou simplesmente curiosos, eles atravessaram a barreira de água. Essa colonização inicial, talvez envolvendo 1.000 indivíduos, começou uma jornada que só parou quando os seres humanos chegaram à Terra do Fogo (no extremo sul da América do Sul) muitos milhares de anos mais tarde. No processo, uma população estabelecida a partir de uma expansão de hominídeos na Eurásia, incluindo o *Homo neanderthalensis*, foi deslocada. Os neandertais desapareceram assim como o *Homo erectus* e outras linhas de hominídeos antes deles.

A história do aparecimento dos seres humanos modernos pela primeira vez na África algumas centenas de milhares de anos atrás, e suas migrações à medida que eles por fim se irradiaram para fora de África, está escrita no DNA. Com a utilização de sequências genômicas de várias espécies, a evolução de primatas e hominídeos se tornou mais nítida. Utilizando haplótipos presentes em populações humanas existentes, é possível traçar as migrações dos intrépidos antepassados humanos em todo o planeta (**Figura 9-35**).

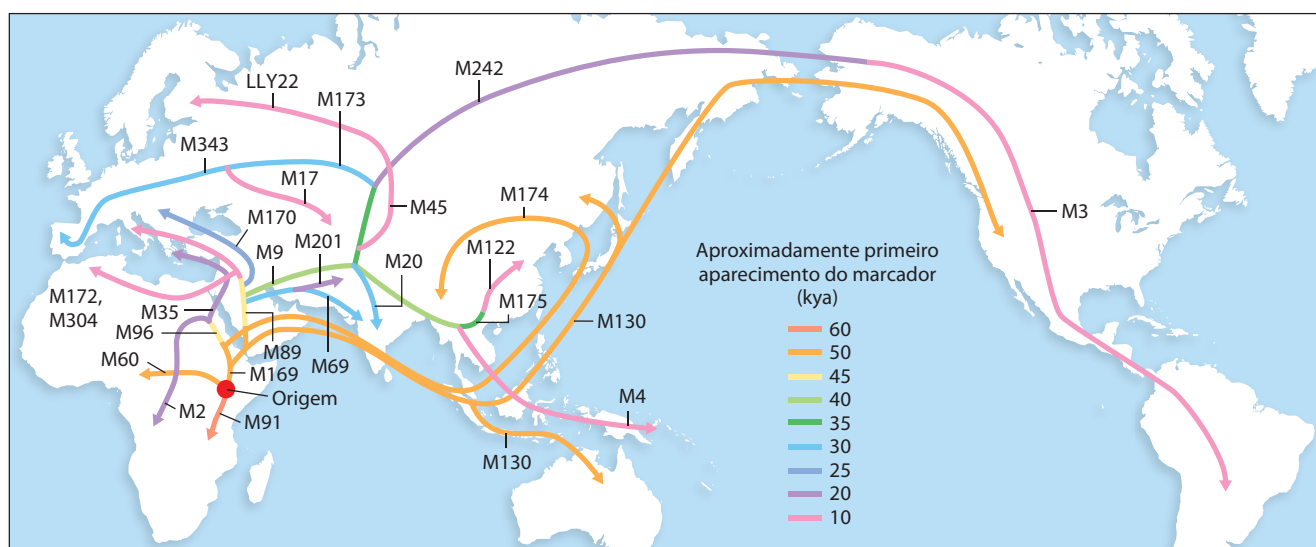



**FIGURA 9-35 Os caminhos das migrações humanas.** Quando uma pequena parte de uma população humana migra para fora de um grande grupo, ela carrega apenas parte de toda sua diversidade genética. Assim, alguns haplótipos estarão presentes no grupo que migrou, mas não todos eles. Ao mesmo tempo, mutações podem criar novos haplótipos ao longo do tempo. Este mapa foi gerado a partir de análises de marcadores genéticos (haplótipos definidos pelos números M ou LLY) no cromossomo Y. As amostras genéticas foram colhidas de populações indígenas há muito estabelecidas em pontos geográficos ao longo das rotas assinaladas. Os haplótipos que aparecem subitamente ao longo do caminho de migração, refletindo novas mudanças (mutações) em localizações genômicas de SNP específicas em algumas populações isoladas, são chamados de "eventos fundadores". Eles permitem aos pesquisadores rastrearem as migrações a partir desse ponto, uma vez que outras populações com o novo haplótipo foram provavelmente descendentes da população fundadora. A abreviação *kya* significa "milhares de anos atrás."

**QUADRO 9-3 MÉTODOS Conhecendo os neandertais**

Os seres humanos modernos e os neandertais conviveram na Europa e Ásia há relativamente recentes 30 mil anos. As populações ancestrais humanas e neandertais divergiram há cerca de 370.000 anos, antes do aparecimento dos seres humanos anatomicamente modernos. Os neandertais utilizavam ferramentas, viviam em pequenos grupos e enterravam seus mortos. Dos parentes hominídeos conhecidos dos humanos modernos, os neandertais são os mais próximos. Durante centenas de milênios, eles habitaram grande parte da Europa e Ásia Ocidental (Figura Q-1). Se o genoma do chimpanzé informe algo sobre o que é ser humano, talvez o genoma neandertal informe mais. Ossos enterrados que permanecem sendo retirados de cemitérios são fragmentos de DNA do genoma neandertal. As tecnologias desenvolvidas para uso em ciência forense (ver Quadro 9-1) e estudos de DNA arqueológico foram combinados para iniciar um projeto genoma neandertal.

Esse esforço é diferente dos projetos genoma que visam espécies existentes. O DNA neandertal está presente em pequenas quantidades contaminadas com o DNA de outros animais e de bactérias. Como se pode chegar até ele e como estar certo de que as sequências são realmente de neandertais? As respostas foram reveladas por aplicações inovadoras da biotecnologia. Essencialmente, as pequenas quantidades de fragmentos de DNA encontradas em um osso neandertal ou outros restos são clonadas em uma biblioteca, e os segmentos de DNA são sequenciados de forma aleatória, inclusive os contaminantes. Os resultados do sequenciamento são comparados com o banco de dados do genoma humano e do chimpanzé existentes. Os segmentos derivados de DNA neandertal são rapidamente diferenciados dos segmentos derivados de bactérias ou insetos por análise computadorizada, porque eles têm sequências estreitamente relacionadas ao DNA humano e do chimpanzé. Quando uma coleção de segmentos de DNA neandertal

**FIGURA Q-1** Os neandertais ocuparam grande parte da Europa e Ásia Ocidental até cerca de 30.000 anos atrás. Os principais sítios arqueológicos neandertais estão aqui mostrados. (Observe que o grupo foi assim chamado por causa do sítio em Neanderthal na Alemanha.)

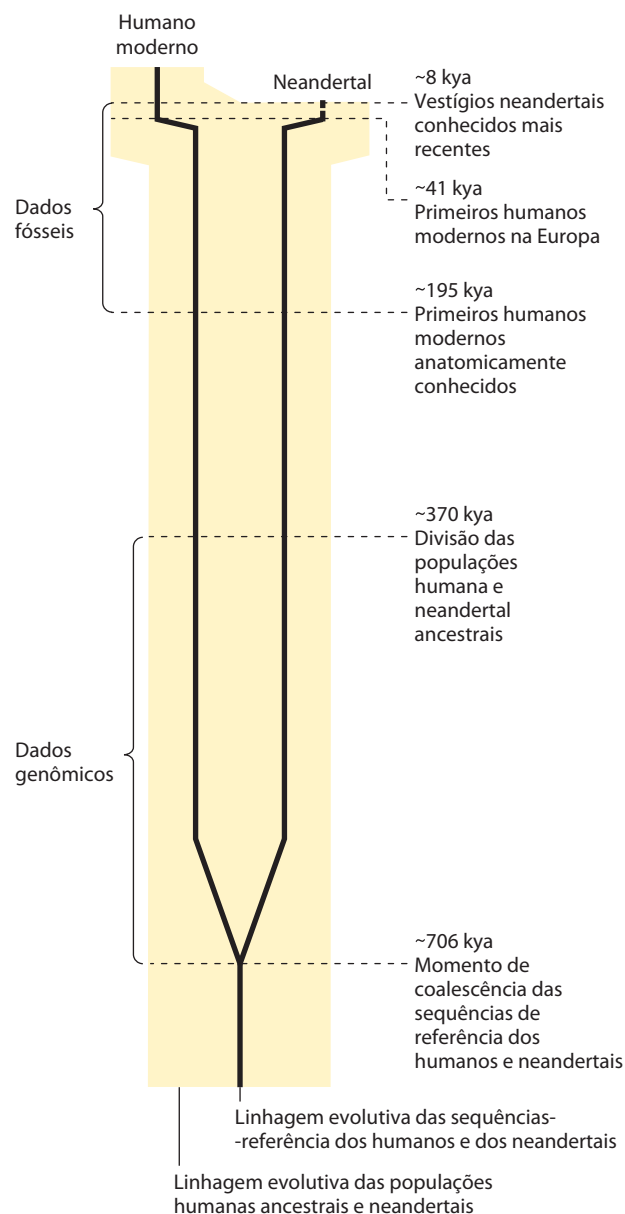
Os neandertais não foram simplesmente deslocados. Ocorreu alguma mistura. Utilizando-se métodos sensíveis com base em PCR, agora está disponível uma sequência quase completa do genoma de neandertais (Quadro 9-3). Sabe-se que cerca de 4% dos genomas humanos de não africanos são derivados de neandertais. Algumas populações humanas também adquiriram o DNA genômico de outro grupo recentemente descoberto, os denisovanos. O DNA de neandertais forneceu aos humanos um sistema imune mais complexo, tornando-nos mais resistentes à infecção, mas também um pouco mais suscetíveis a doenças autoimunes. A história do passado humano está gradualmente tomando forma à medida que mais genomas humanos, dos vivos hoje e daqueles que viveram em milênios passados, estão sendo reunidos.

A promessa médica de sequências genômicas pessoais cresce à medida que mais genes subjacentes a doenças hereditárias são definidos. O conhecimento de sequências genômicas também oferece a possibilidade de alterá-los. Atualmente é comum modificar sequências de DNA de organismos a partir de bactérias e leveduras para plantas e mamíferos para fins de investigação e comercialização. Os esforços para

é sequenciada, pode ser utilizada como sonda para identificar os fragmentos de sequência em amostras antigas que se sobrepõem a esses fragmentos conhecidos. O potencial problema de contaminação com o DNA humano moderno estreitamente relacionado pode ser controlado pela análise do DNA mitocondrial. As populações humanas têm haplótipos facilmente identificáveis (conjuntos distintos de diferenças genômicas; ver Figura 9-30) no seu DNA mitocondrial, e a análise de amostras de neandertais mostrou que o DNA mitocondrial neandertal tem seus próprios haplótipos distintos. A presença nas amostras neandertais de algumas diferenças encontradas em pares de bases no banco de dados do chimpanzé, mas não no banco de dados humano, é mais uma evidência de que as sequências de hominídeos não humanos foram encontradas.

A conclusão dessa tarefa desafiadora está no horizonte. O projeto de sequenciamento do genoma neandertal, revelado no início de 2009, abrangeu mais de 60% das sequências genômicas. O sequenciamento final vai exigir um pouco mais de tempo. Os dados fornecem evidências de que os humanos modernos e os neandertais que foram a fonte desse DNA compartilharam um ancestral comum cerca de 700.000 anos atrás (Figura Q-2). A análise do DNA mitocondrial sugere que os dois grupos continuaram no mesmo caminho, com algum fluxo gênico entre eles, ao longo de mais 300 mil anos. As linhagens se separaram com a aparência de humanos anatomicamente modernos, embora hoje existam evidências para algum entrelaçamento das linhagens um pouco mais tarde.

Bibliotecas expandidas de DNA neandertal de diferentes conjuntos de restos mortais devem finalmente permitir uma análise da diversidade genética neandertal e, talvez, migrações de neandertais, oferecendo um fascinante olhar sobre o nosso passado hominídeo.

**FIGURA Q-2** Esta linha do tempo mostra a divergência das sequências genômicas (linhas pretas) humanas e neandertais e das populações humanas ancestrais e neandertais (em amarelo). Os dados genômicos fornecem evidências para alguma intermistura das populações até cerca de 45.000 anos atrás. Eventos-chave na evolução humana são marcados.

curar doenças humanas hereditárias com terapia genética ainda não atingiram todo seu potencial, mas tecnologias para o fornecimento de genes estão constantemente se aperfeiçoando. Poucas disciplinas científicas afetarão o futuro da espécie humana mais do que a genômica moderna.

## RESUMO 9.3 Genômica e história da humanidade

- Métodos de sequenciamento de última geração têm reduzido muito o tempo necessário para gerar sequências genômicas completas.
- Cerca de 30% do DNA no genoma humano estão nos éxons e íntrons dos genes que codificam proteínas. Cerca de metade do DNA é derivada de transposons parasitas. Muito do restante codifica RNA de muitos tipos. Sequências repetidas simples compõem o centrômero e telômeros.
- As alterações de genes que definem a humanidade podem ser discernidas em parte pela genômica comparativa utilizando-se outros primatas.
- A genômica comparativa também é utilizada para localizar as alterações no gene que definem doenças here-

ditárias e pode ser utilizada para estudar a evolução e a migração de nossos ancestrais humanos ao longo de milênios.

## Termos-chave

*Termos em negrito são definidos no glossário.*



## Leituras adicionais

### Geral


**Jackson, D.A., Symons, R.H., & Berg, P.** (1972) Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose óperon of *Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2904-2909.

O primeiro experimento com DNA recombinante ligando o DNA de duas espécies.

**Lobban, P.E. & Kaiser, A.D.** (1973) Enzymatic end-to-end joining of DNA molecules. *J. Mol. Biol.* 78, 453-471.

Relato do primeiro experimento com DNA recombinante.


### Estudo dos genes e seus produtos


**Arnheim, N. & Erlich, H.** (1992) Polymerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 131-156.

**Foster, E.A., Jobling, M.A., Taylor, P.G., Donnelly, P., de Knijff, P., Mieremet, R., Zerjal, T., & Tyler-Smith, C.** (1999) The Thomas Jefferson paternity case. *Nature* 397, 32.

Último artigo de uma série de um interessante estudo de caso sobre o uso da biotecnologia para lidar com questões históricas.

**Giepmans, B.N.G., Adams, S.R., Ellisman, M.H., & Tsien, R.Y.** (2006) The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* 312, 217-224.

**Kayser, M. & de Knijff, P.** (2011) Improving human forensics through advances in genetics, genomics, and molecular biology. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 179-192.

**Ståhl, P.L. & Lundeber, J.** (2012) Toward the singlehour high-quality genome. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 359-378.

**Zhao, J. & Grant, S.F.A.** (2011) Advances in whole genome sequencing technology. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **12**, 293-305.


### Utilização de métodos com base no DNA para a compreensão das funções das proteínas


**Budowle, B., Johnson, M.D., Fraser, C.M., Leighton, T.J., Murch, R.S., & Chakraborty, R.** (2005) Genetic analysis and attribution of microbial forensics evidence. *Crit. Rev. Microbiol.* 31, 233-254.

Como a biotecnologia é utilizada contra o bioterrorismo.

**Koonin, E.V.** (2005) Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 309-338.

Boa descrição de parte da genômica comparativa básica.

**Stoughton, R.B.** (2005) Applications of DNA microarrays in biology. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 53-82.

**Terpe, K.** (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *App. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 211-222.

**Yooseph, S., Sutton, G., Rusch, D.B., Halpern, A.L., Williamson, S.J., Remington, K., Eisen, J.A., Heidelberg, K.B., Manning, G., Li, W., et al.** (2007) The *Sorcerer II* global ocean sampling expedition: expanding the universe of protein families. *PLoS Biol.* 5, e16.

Artigo que compõe uma série originada de um esforço ambicioso para provar a biodiversidade microbiana em todos os oceanos do mundo.


### Genômica e história da humanidade


**Alkan, C., Sajjadian, S., & Eichler, E.E.** (2011) Limitations of next-generation genome sequence assembly. *Nat. Methods.* 8, 61-65.

**Callaway, E.** (2011) Ancient DNA reveals secrets of human history. *Nature* **476**, 136-137.

**Carr, P.A. & Church, G.M.** (2009) Genome engineering. *Nat. Biotechnol.* **27**, 1151-1162.

**Carroll, S.B.** (2003) Genetics and the making of *Homo sapiens. Nature* **422**, 849-857.

**Gonzaga-Jauregui, C., Lupski, J.R., & Gibbs, R.A.** (2012) Human genome sequencing in health and disease. *Annu. Rev.Med.* **63**, 35-61.

**Green, E.D. & Guyer, M.S.** (2011) Charting a course for genomic medicine from base pairs to bedside. *Nature* **470**, 204-213.

**Kay, M.A.** (2011) State-of -the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 316-328.

**Lander, E.S.** (2011) Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature* **470**, 187-197.

**Metzker, M.L.** (2010) Sequencing technologies: the next generation. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 31-46.

**Perkel, J.M.** (2011) Synthetic genomics: building a better bacterium. *Science* **331**, 1628-1630.

**Reich, D., Green, R.E., Kircher, M., Krause, J., Patterson, N., Durand, E.Y., Viola, B., Briggs, A.W., Stenzel, U., Johnson, P.L., et al.** (2010) Genetic history of an archaic hominin group from Denisova cave in Siberia. *Nature* 468, 1053-1060.

Os neandertais não foram os únicos outros grupos de hominídeos que os humanos encontraram em sua viagem através do continente asiático.

**Stoneking, M. & Krause, J.** (2011) Learning about human population history from ancient and modern genomes. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 603-614.

## Problemas

**1. Produção de DNA clonado.** Quando liga dois ou mais fragmentos de DNA, um pesquisador pode ajustar a sequência na junção de vários modos diferentes, como será visto nos exercícios a seguir.

(a) Desenhe a estrutura de cada extremidade de um fragmento linear de DNA produzido por digestão com a enzima de restrição *Eco*RI (inclua aquelas sequências remanescentes da sequência de reconhecimento da enzima *Eco*RI).

(b) Desenhe a estrutura resultante da reação dessa sequência final com a DNA-polimerase I e os quatro desoxinucleosídeos trifosfatos (ver Figura 8-33).

(c) Desenhe a sequência produzida na junção que se forma se as duas extremidades com a estrutura obtida em (b) forem ligadas (ver Figura 25-16).

(d) Desenhe a estrutura produzida se a estrutura obtida em (a) for tratada com uma nuclease que degrade apenas DNA de fita simples.

(e) Desenhe a sequência da junção produzida se uma extremidade com a estrutura (b) for ligada a uma extremidade com a estrutura (d).

(f) Desenhe a estrutura da extremidade de um fragmento linear de DNA que foi produzido por digestão com a enzima de restrição *Pvu*II (inclua aquelas sequências remanescentes da sequência de reconhecimento da enzima *Pvu*II).

(g) Desenhe a sequência da junção produzida se uma extremidade com estrutura (b) estiver ligada a uma extremidade com a estrutura (f).

(h) Suponha que você sintetize um fragmento de DNA duplo curto com qualquer sequência desejada. Com esse fragmento sintético e os procedimentos descritos de (a) até (g), crie um protocolo que permita remover um sítio de restrição de *Eco*RI de uma molécula de DNA e incorporar um novo sítio de restrição de *Bam*HI aproximadamente no mesmo local (ver Figura 9-2).

(i) Desenhe quatro fragmentos sintéticos curtos diferentes de DNA de fita dupla que permitam a ligação da estrutura (a) com um fragmento de DNA produzido por digestão com a enzima de restrição *Pst*I. Em um desses fragmentos, desenhe a sequência de modo que a junção final contenha as sequências de reconhecimento tanto para *Eco*RI quanto para *Pst*I. No segundo e terceiro fragmentos, desenhe a sequência de modo que a junção contenha apenas a sequência de reconhecimento *Eco*RI e *Pst*I, respectivamente. Desenhe a sequência do quarto fragmento, de modo que nem *Eco*RI ou *Pst*I apareçam na junção.

**2. Seleção de plasmídeos recombinantes.** Quando se clona um fragmento de DNA exógeno em um plasmídeo, é frequentemente útil inserir o fragmento em um sítio que interrompa um marcador de seleção (como o gene de resistência à tetraciclina de pBR322). A perda da função do gene interrompido pode ser utilizada para identificar os clones que contêm os plasmídeos recombinantes com o DNA exógeno. Com o vetor bacteriófago $\lambda$, isso não é necessário, pois é muito fácil distinguir os vetores que incorporaram fragmentos grandes de DNA exógeno daqueles que não o incorporam. Como esses vetores recombinantes podem ser identificados?

**3. Clonagem de DNA.** O vetor de clonagem plasmídeo pBR322 (ver Figura 9-3) é clivado com a endonuclease de restrição *Pst*I. Um fragmento de DNA isolado de um genoma eucariótico (também obtido por clivagem com *Pst*I) é adicionado ao vetor preparado e ligado. A mistura de DNA ligado é então utilizada para transformar bactérias, e as bactérias que contêm os plasmídeos são selecionadas pelo crescimento em presença de tetraciclina.

(a) Além do plasmídeo recombinante desejado, quais outros tipos de plasmídeos podem ser encontrados entre as bactérias transformadas que são resistentes à tetraciclina? Como podem ser diferenciados?

(b) O fragmento de DNA clonado tem um tamanho de 1.000 pb e um sítio de *Eco*RI a 250 pb de uma extremidade. Três plasmídeos recombinantes diferentes foram clivados com *Eco*RI e analisados por eletroforese em gel, com os padrões mostrados a seguir. O que cada padrão de restrição nos informa a respeito do DNA clonado? Note que em pBR322, os sítios de restrição de *Eco*RI e *Pst*I estão distantes cerca de 750 pb. O plasmídeo inteiro, sem o clone inserido, tem um tamanho de 4.361 pb. Marcadores de tamanho na canaleta 4 possuem o número de nucleotídeos observado.

**4. Enzimas de restrição.** A sequência parcial de uma fita de uma molécula de DNA de fita dupla é:

5′ – – – GACGAAGTGCTGCAGAAAGTCCGCGTTATAGGCAT GAATTCCTGAGG – – – 3′

Os sítios de clivagem para as enzimas de restrição *Eco*RI e *Pst*I são mostrados a seguir.

```
EcoRI       ↓ *                     PstI            * ↓
      (5′) G A A T T C (3′)          (5′) C T G C A G (3′)
           C T T A A G                    G A C G T C
                 *  ↑                     ↑   *
```

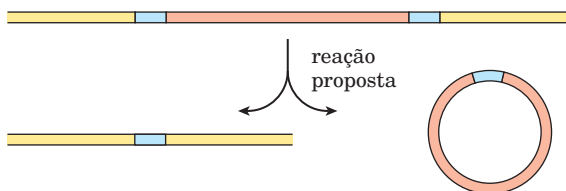
Escreva a sequência de ambas as fitas do fragmento de DNA criado quando o DNA é clivado tanto por *Eco*RI como por *Pst*I. A fita superior de seu fragmento de DNA duplo deve ser derivada da sequência da fita mostrada a seguir.

**5. Desenhando um teste diagnóstico para uma doença genética.** A doença de Huntington (DH) é um distúrbio hereditário neurodegenerativo, caracterizado por um dano gradual e irreversível das funções psicológicas, motoras e cognitivas. Os sintomas normalmente aparecem na meia-idade, mas podem ocorrer em praticamente qualquer idade. O curso da doença pode durar de 15 a 20 anos. As bases moleculares da doença se tornam cada vez mais bem compreendidas. A mutação genética subjacente à DH foi identificada em um gene codificador de uma proteína ($M_r$ 350.000) de função desconhecida. Em indivíduos que não desenvolverão DH, a re-

gião do gene que codifica a porção aminoterminal da proteína tem uma sequência de códons CAG (para glutamina) que se repetem de 6 a 39 vezes em sucessão. Em indivíduos com início da doença na vida adulta, esse códon é normalmente repetido de 40 a 55 vezes. Em indivíduos com início da doença na infância, esse códon se repete mais de 70 vezes. O comprimento dessa simples repetição de trinucleotídeos indica se o indivíduo desenvolverá DH e a idade aproximada em que os primeiros sintomas aparecerão.

Uma pequena porção da sequência codificadora da porção aminoterminal do gene da DH de 3.143 códons é mostrada a seguir. A sequência de nucleotídeos do DNA está mostrada em preto, a sequência de aminoácidos correspondente ao gene está mostrada em azul e a repetição CAG está sombreada. Utilizando a Figura 27-7 para traduzir o código genético, desenhe um teste com base em PCR para DH utilizando uma amostra de sangue. Presuma que o oligonucleotídeo iniciador da PCR deva ter 25 nucleotídeos de comprimento. Por convenção, a menos que seja especificada, uma sequência de DNA codificadora de uma proteína é mostrada com a fita codificadora (a sequência idêntica ao mRNA transcrito desse gene) superior que é lida de 5′ para 3′, da esquerda para a direita.

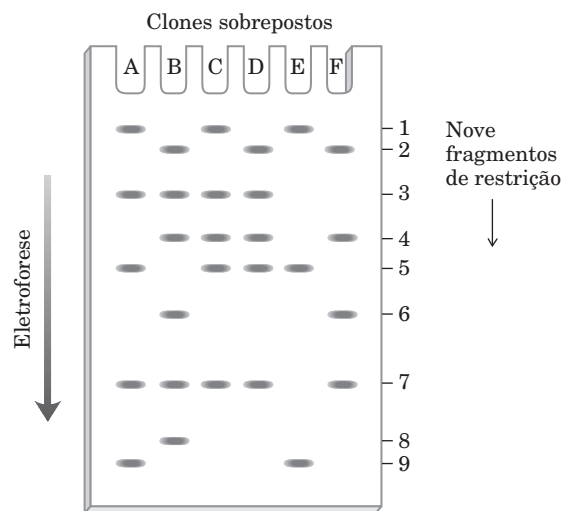
Fonte: The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72, 971-983.

**6. Utilizando PCR para detectar moléculas de DNA circular.** Em uma espécie de protista ciliado, um segmento do DNA genômico é, algumas vezes, excluído. A exclusão é uma reação geneticamente programada associada à reprodução celular. Um pesquisador propôs a exclusão do DNA em um tipo de recombinação chamada de recombinação sítio-específica, em que ambas as extremidades do segmento de DNA se ligam, e o DNA excluído acaba formando um produto de reação de DNA circular.

Sugira como o pesquisador poderia utilizar a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar a presença da forma circular do DNA excluído em um extrato do protista.

**7. Plantas brilhantes.** Quando cresce em solo comum de jardim e com abastecimento de água normal, uma planta modificada geneticamente para expressar a proteína fluorescente verde (ver Figura 9-16) brilhará no escuro, enquanto uma planta modificada geneticamente para expressar luciferase de vaga-lume não ficará brilhante. Explique essas observações.

**8. Desenhando oligonucleotídeos iniciadores para PCR.** Uma fita de uma sequência de DNA cromossomal é mostrada na parte superior da próxima coluna. Um investigador deseja amplificar e isolar um fragmento de DNA definido pelo segmento mostrado em vermelho utilizando a reação em cadeia da polimerase. Desenhe dois oligonucleotídeos iniciadores de PCR, cada com 20 nucleotídeos de comprimento, que possam ser utilizados para amplificar esse segmento de DNA.

5′ – – – AATGCCGTCAGCCGATCTGCCTCGAGTCAATCGA
TGCTGGTAACTTGGGGTATAAAGCTTACCCATGGTATCG
TAGTTAGATTGATTGTTAGGTTCTTAGGTTTAGGTTTC
TGGTATTGGTTTAGGGTCTTTGATGCTATTAATTGTTTGG
TTTTGATTTGGTCTTTATATGGTTTATGTTTTAAGCCGGGT
TTTGTCTGGGATGGTTCGTCTGATGTGCGCGTAGCGTGCG
GCG – – – 3′

**9. Mapeando um segmento de cromossomo.** Um grupo de clones sobrepostos, denominados de A a F, é isolado de uma região de um cromossomo. Cada um dos clones é clivado separadamente por uma enzima e os fragmentos são separados por eletroforese em gel de agarose, com os resultados apresentados a seguir. Há nove fragmentos de restrição diferentes nessa região do cromossomo, com um subconjunto aparecendo em cada clone. Utilizando essa informação, deduza a ordem dos fragmentos de restrição no cromossomo.

**10. Imunofluorescência.** No protocolo mais comum para detecção por imunofluorescência de proteínas celulares, um investigador utiliza dois anticorpos. O primeiro se liga especificamente à proteína de interesse. O segundo é marcado com fluorocromos para facilitar a visualização e se liga ao primeiro anticorpo. Em princípio, seria possível simplesmente marcar o primeiro anticorpo e pular uma etapa. Por que utilizar dois anticorpos sucessivos?

**11. Análise duplo-híbrido em leveduras.** Você é um pesquisador que acaba de descobrir uma nova proteína em um fungo. Planeje um experimento de duplo-híbrido em leveduras para identificar as outras proteínas na célula do fungo com as quais sua proteína interage e explique como isso pode ajudá-lo a determinar a função da sua proteína.

**12. Uso da fotolitografia para fazer um microarranjo de DNA.** A Figura 9-22 mostra os primeiros passos no processo de produção de um microarranjo, ou *chip* de DNA, usando

fotolitografia. Descreva os próximos passos necessários para a obtenção das sequências desejadas (sequência de quatro nucleotídeos diferentes em cada um dos quatro pontos) mostrada no primeiro painel da figura. Após cada etapa, mostre a sequência de nucleotídeos resultante ligada a cada posição.

**13. Sequenciamento genômico.** Em grandes projetos de sequenciamento genômico, os dados iniciais geralmente revelam lacunas onde não foi obtida nenhuma informação sobre a sequência. Para fechar essas lacunas, oligonucleotídeos iniciadores de DNA complementares à fita de extremidade 5′ (i.e., idêntica à sequência da fita de extremidade 3′) na extremidade de cada contig são extremamente úteis. Explique como esses oligonucleotídeos iniciadores podem ser utilizados.

**14. Uso de grupos externos em genômica comparativa.** Uma proteína hipotética é encontrada em orangotangos, chimpanzés e seres humanos, com as seguintes sequências (vermelho indica as diferenças de resíduos de aminoácidos):

Humano: ATSAAG**Y**DEWEGGK**V**LIHL – – KLQNRGALL ELDIGAV

Orangotango: ATSAAG**W**DEWEGGK**V**LIHL**DG**KLQNRGALL ELDIGAV

Chimpanzé: ATSAAG**W**DEWEGGK**I**LIHL**DG**KLQNRGALL ELDIGAV

(Traços indicam uma exclusão – os resíduos estão faltando nessa sequência)

Qual é a sequência mais provável da proteína presente no último ancestral comum de chimpanzés e seres humanos?

**15. Encontrando genes de doenças.** Você é um caçador de genes tentando encontrar a base genética de uma doença hereditária rara. O exame de seis linhagens de famílias afetadas pela doença fornece resultados inconsistentes. Para duas das famílias, a doença é co-herdada com marcadores no cromossomo 7. Para as outras quatro famílias, a doença é co-herdada com marcadores no cromossomo 12. Explique como isso pode ocorrer.

## Problema de análise de dados

**16. *Hinc*II: A primeira endonuclease de restrição.** A descoberta da primeira endonuclease de restrição e o seu uso prático foram descritos em dois artigos científicos publicados em 1970. No primeiro trabalho, Smith e Wilcox descreveram o isolamento de uma enzima que clivava o DNA de fita dupla. Eles inicialmente demonstraram a atividade de nuclease da enzima medindo a redução da viscosidade de amostras de DNA tratadas com essa enzima.

(a) Por que o tratamento com a nuclease reduz a viscosidade de uma solução de DNA?

Os autores determinaram se a enzima era uma endo ou exonuclease por meio do tratamento da enzima com DNA marcado com $P^{32}$ e, em seguida, adicionando ácido tricloroacético (TCA). Nessas condições utilizadas em seus experimentos, os nucleotídeos livres são solúveis em TCA enquanto os oligonucleotídeos precipitam.

(b) Não se formou nenhum material marcado com $P^{32}$ solúvel em TCA após o tratamento do DNA marcado com $P^{32}$ com a nuclease. Com base nesse resultado, essa enzima é uma endo ou exonuclease? Justifique sua argumentação. Quando um polinucleotídeo é clivado, o fosfato geralmente não é removido e permanece ligado na extremidade 5′ ou 3′ do fragmento de DNA resultante. Smith e Wilcox determinaram a localização do fosfato no fragmento formado pela nuclease nas seguintes etapas:

1. Tratar o DNA não marcado com a nuclease.
2. Tratar uma amostra (A) do produto com $\gamma$-$P^{32}$-ATP e polinucleotídeo cinase (que pode ligar o $\gamma$-fosfato do ATP a uma 5′-OH, mas não para um 5′-fosfato ou para 3′-OH ou 3′-fosfato). Medir a quantidade de $P^{32}$ incorporado no DNA.
3. Tratar outra amostra (B) do produto da etapa 1 com fosfatase alcalina (que remove grupos fosfato das extremidades 5′ e 3′ livres) seguida por polinucleotídeo cinase e $\gamma$-$P^{32}$-ATP. Medir a quantidade de $P^{32}$ incorporado no DNA.

(c) Smith e Wilcox descobriram que a amostra A tinha 136 contagens/minuto de $P^{32}$; a amostra B tinha 3.740 contagens/minuto. A clivagem pela nuclease deixou o fosfato na extremidade 5′ ou 3′ dos fragmentos de DNA? Justifique sua argumentação.

(d) O tratamento do DNA do bacteriófago T7 com a nuclease gerou cerca de 40 fragmentos específicos de comprimentos variados. Como esse resultado pode ser consistente com o fato de a enzima reconhecer uma sequência específica no DNA, em vez de realizar uma clivagem da fita dupla em regiões aleatórias?

Nesse ponto, havia duas possibilidades para a clivagem sítio-específica: a clivagem poderia ocorrer no sítio de reconhecimento (1) ou próxima ao sítio de reconhecimento (2), mas não dentro da sequência reconhecida. Para direcionar essa investigação, Kelly e Smith determinaram a sequência das extremidades 5′ dos fragmentos de DNA gerados pela nuclease, nas seguintes etapas:

1. Tratar o DNA do fago T7 com a enzima.
2. Tratar os fragmentos resultantes com fosfatase alcalina para remover os fosfatos das extremidades 5′.
3. Tratar os fragmentos desfosforilados com polinucleotídeo cinase e $\gamma$-$P^{32}$-ATP para marcar as extremidades 5′.
4. Tratar as moléculas marcadas com DNases para quebrá-las em uma mistura de mono, bi e trinucleotídeos.
5. Determinar a sequência dos mono, bi e trinucleotídeos marcados comparando-os com oligonucleotídeos de sequência conhecida por cromatografia de camada delgada.

Os produtos marcados foram identificados como: mononucleotídeos: A e G; dinucleotídeos: (5′) ApA (3′) e (5′) GpA (3′); trinucleotídeos: (5′) ApApC (3′) e (5′) GpApC (3′).

(e) Qual modelo de clivagem é consistente com esses resultados? Explique sua argumentação.

Kelly e Smith tentaram determinar a sequência das extremidades 3′ dos fragmentos. Constataram uma mistura de (5′) TpC (3′) e (5′)TpT (3′). Eles não determinaram a sequência de nenhum dos trinucleotídeos na extremidade 3′.

(f) Com base nesses dados, qual é a sequência de reconhecimento para a nuclease e em qual ponto na sequência o esqueleto de DNA é clivado? Utilize a Tabela 9-2 como modelo para sua resposta.

## Referências

**Kelly, T.J. & Smith, H.O.** (1970) A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*: II. Base sequence of the recognition site. *J. Mol. Biol.* **51**, 393-409.

**Smith, H.O. & Wilcox, K.W.** (1970) A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*: I. Purification and general properties. *J. Mol. Biol.* **51**, 379-391.

10

# Lipídeos



Os lipídeos biológicos são um grupo de compostos quimicamente diversos, cuja característica em comum que os define é a insolubilidade em água. As funções biológicas dos lipídeos são tão diversas quanto a sua química. Gorduras e óleos são as principais formas de armazenamento de energia em muitos organismos. Os fosfolipídeos e os esteróis são os principais elementos estruturais das membranas biológicas. Outros lipídeos, embora presentes em quantidades relativamente pequenas, desempenham papéis cruciais como cofatores enzimáticos, transportadores de elétrons, pigmentos fotossensíveis, âncoras hidrofóbicas para proteínas, chaperonas para auxiliar no enovelamento de proteínas de membrana, agentes emulsificantes no trato digestivo, hormônios e mensageiros intracelulares. Este capítulo apresenta os lipídeos mais representativo de cada um dos tipos de lipídeos, organizados de acordo com suas funções, com ênfase na estrutura química e nas propriedades físicas. Embora a discussão siga uma organização funcional, os milhares de lipídeos diferentes também podem ser organizados em oito categorias gerais de acordo com sua estrutura química (ver Tabela 10-3). A geração de energia pela oxidação de lipídeos será abordada no Capítulo 17 e sua síntese no Capítulo 21.

## 10.1 Lipídeos de armazenamento

As gorduras e os óleos utilizados de modo quase universal como formas de armazenamento de energia nos organismos vivos são derivados de **ácidos graxos**. Os ácidos graxos são derivados de hidrocarbonetos, com estado de oxidação quase tão baixo (ou seja, altamente reduzido) quanto os hidrocarbonetos nos combustíveis fósseis. A oxidação celular de ácidos graxos (a $CO_2$ e $H_2O$), assim como a combustão controlada e rápida de combustíveis fósseis em motores de combustão interna, é altamente exergônica.

Neste capítulo são apresentadas as estruturas e a nomenclatura dos ácidos graxos mais encontrados em organismos vivos. Dois tipos de compostos que contêm ácidos graxos, os triacilgliceróis e as ceras, são descritos para ilustrar a diversidade de estrutura e propriedades físicas dessa família de compostos.

### Os ácidos graxos são derivados de hidrocarbonetos

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas de comprimento variando de 4 a 36 carbonos ($C_4$ a $C_{36}$). Em alguns ácidos graxos, essa cadeia é totalmente saturada (não contém ligações duplas) e não ramificada; em outros, a cadeia contém uma ou mais ligações duplas (Tabela 10-1). Alguns poucos contêm anéis de três carbonos, grupos hidroxila ou ramificações de grupos metila.

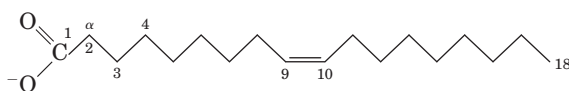
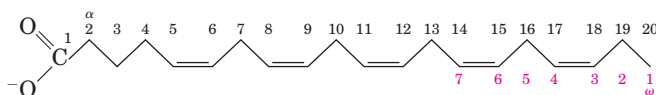
**CONVENÇÃO-CHAVE:** Uma nomenclatura simplificada para ácidos graxos não ramificados especifica o comprimento da cadeia e o número de ligações duplas, separados por dois pontos (**Figura 10-1a**); por exemplo, o ácido palmítico, saturado e com 16 carbonos, é abreviado 16:0, e o ácido

**(a)** 18:1($\Delta^9$) ácido *cis*-9-octadecenoico

**(b)** 20:5($\Delta^{5,8,11,14,17}$) ácido eicosapentaenoico (EPA), um ácido graxo ômega-3

**FIGURA 10-1 Duas convenções para a nomenclatura de ácidos graxos. (a)** A nomenclatura-padrão designa o número 1 para o carbono da carboxila (C-1) e a letra $\alpha$ para o carbono ligado a ele. Cada segmento linear em ziguezague representa uma ligação simples entre carbonos adjacentes. As posições de quaisquer ligações duplas são indicadas pelo $\Delta$, seguido de um número sobrescrito que indica o carbono de número mais baixo na ligação dupla. **(b)** Para ácidos graxos poli-insaturados, uma convenção alternativa numera os carbonos na direção oposta, designando o número 1 ao carbono da metila na outra extremidade da cadeia; este carbono também é designado $\omega$ (ômega; a última letra do alfabeto grego). As posições das ligações duplas são indicadas em relação ao carbono $\omega$.

**TABELA 10-1** Alguns ácidos graxos que ocorrem naturalmente: estrutura, propriedades e nomenclatura

| Esqueleto de carbono | Estrutura* | Nome sistemático** | Nome comum (derivação) | Ponto de fusão (°C) | Solubilidade a 30°C (mg/g solvente) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Água | Benzeno |
| 12:0 | $CH_3(CH_2)_{10}COOH$ | Ácido *n*-dodecanoico | Ácido láurico (do latim, *laurus*, "árvore de louro") | 44,2 | 0,063 | 2.600 |
| 14:0 | $CH_3(CH_2)_{12}COOH$ | Ácido *n*-tetradecanoico | Ácido mirístico (do latim, *Myristica*, gênero da noz-moscada) | 53,9 | 0,024 | 874 |
| 16:0 | $CH_3(CH_2)_{14}COOH$ | Ácido *n*-hexadecanoico | Ácido palmítico (do latim, *palma*, "palmeira") | 63,1 | 0,0083 | 348 |
| 18:0 | $CH_3(CH_2)_{16}COOH$ | Ácido *n*-octadecanoico | Ácido esteárico (do grego, *stear*, "gordura dura") | 69,6 | 0,0034 | 124 |
| 20:0 | $CH_3(CH_2)_{18}COOH$ | Ácido *n*-eicosanoico | Ácido araquídico (do latim, *Arachis*, gênero de leguminosa) | 76,5 | | |
| 24:0 | $CH_3(CH_2)_{22}COOH$ | Ácido *n*-tetracosanoico | Ácido lignocérico (do latim, *lignum*, "madeira" + *cera*) | 86,0 | | |
| 16:1($\Delta^9$) | $CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_7COOH$ | Ácido *cis*-9-hexadecenoico | Ácido palmitoleico | 1 a –0,5 | | |
| 18:1($\Delta^9$) | $CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$ | Ácido *cis*-9-octadecenoico | Ácido oleico (do latim, *oleum*, "óleo") | 13,4 | | |
| 18:2($\Delta^{9,12}$) | $CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$ | Ácido *cis*-,*cis*-9,12-octadecadienoico | Ácido linoleico (do grego, *linon*, "linho") | 1-5 | | |
| 18:3($\Delta^{9,12,15}$) | $CH_3CH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$ | Ácido *cis*-,*cis*-,*cis*-9,12,15-octadecatrienoico | Ácido $\alpha$-linolênico | –11 | | |
| 20:4($\Delta^{5,8,11,14}$) | $CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_3COOH$ | Ácido *cis*-,*cis*-,*cis*-,*cis*-5,8,11,14-eicosatetraenoico | Ácido araquidônico | –49,5 | | |

* Todos os ácidos estão apresentados em sua forma não ionizada. Em pH 7, todos os ácidos graxos livres apresentam um carboxilato ionizado. Observe que a numeração dos átomos de carbono começa no carbono do carboxila.
** O prefixo "*n*-" indica a estrutura "normal", não ramificada. Por exemplo, "dodecanoico" simplesmente indica 12 átomos de carbono, os quais poderiam estar dispostos em várias formas ramificadas; "*n*-dodecanoico" especifica a forma linear, não ramificada. Para ácidos graxos insaturados, a configuração de cada ligação dupla está indicada; em ácidos graxos biológicos, a configuração é quase sempre *cis*.

oleico, com 18 carbonos e uma ligação dupla, é 18:1. A posição de qualquer ligação dupla é especificada em relação ao carbono carboxílico, o qual recebe o número 1, pelos números sobrescritos ao Δ (delta); um ácido graxo com 20 carbonos e uma ligação dupla entre C-9 e C-10 (sendo C-1 o carbono da carboxila) e outra entre C-12 e C-13 é designado 20:2($\Delta^{9,12}$). ■

Os ácidos graxos de ocorrência mais comum apresentam um número par de átomos de carbono em uma cadeia não ramificada de 12 a 24 carbonos (Tabela 10-1). Como será visto no Capítulo 21, o número par de carbonos resulta do modo como esses compostos são sintetizados, o que envolve condensações sucessivas de unidades de dois carbonos (acetato).

Também há um padrão comum na localização das ligações duplas; na maioria dos ácidos graxos monoinsaturados, a ligação dupla ocorre entre C-9 e C-10 ($\Delta^9$), e as outras ligações duplas dos ácidos graxos poli-insaturados geralmente são $\Delta^{12}$ e $\Delta^{15}$. (O ácido araquidônico é uma exceção a essa generalização.) As ligações duplas dos ácidos graxos poli-insaturados quase nunca são conjugadas (alternando ligações simples e duplas, como em $—CH{=}CH—CH{=}CH—$), mas são separadas por um grupo metileno: $—CH{=}CH—CH_2—CH{=}CH—$ (Figura 10-1b). Em quase todos os ácidos graxos insaturados que ocorrem naturalmente, as ligações duplas encontram-se em configuração *cis*. Ácidos graxos *trans* são produzidos pela fermentação no rúmen de animais leiteiros, e são obtidos dos laticínios e da carne.

**CONVENÇÃO-CHAVE:** A família de **ácidos graxos poli-insaturados** (**AGPI**) com uma ligação dupla entre o terceiro e o quarto carbono a partir da extremidade da cadeia com grupo metila é de importância especial na nutrição humana. Como o papel fisiológico dos ácidos graxos poli-insaturados está relacionado mais à posição da primeira ligação dupla próxima à extremidade da cadeia com o grupo *metila* em vez da extremidade contendo a carboxila, uma nomenclatura alternativa algumas vezes é utilizada para esses ácidos graxos. O carbono do grupo metila – isto é, o carbono mais distante do grupo carboxila – é chamado de carbono $\omega$ e recebe o número 1 (Figura 10-1b). Nessa convenção, os ácidos graxos poli-insaturados com uma ligação dupla entre C-3 e C-4 são chamados de **ácidos graxos ômega-3** (**$\omega$-3**) e aqueles com a ligação dupla entre C-6 e C-7 são **ácidos graxos ômega-6** (**$\omega$-6**). ■

Embora os seres humanos não disponham da capacidade de sintetizar o ácido ômega-3-AGPI-$\alpha$-linolênico (ALA, 18:3 [$\Delta^{9,12,15}$], na convenção padrão), ele é necessário e, portanto, deve ser obtido a partir da dieta. A partir do ALA, os seres humanos podem sintetizar dois outros AGPI ômega-3 importantes no funcionamento celular: o ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5[$\Delta^{5,8,11,14,17}$], mostrado na Figura 10-1b) e o ácido docosaexaenoico (DHA; 22:6[$\Delta^{4,7,10,13,16,19}$]). Um desequilíbrio entre os AGPI ômega-6 e ômega-3 na dieta está associado a um risco aumentado de doenças cardiovasculares. A proporção ótima de AGPI ômega-6 para ômega-3 na dieta está entre 1:1 e 4:1, mas a proporção nas dietas da maioria dos norte-americanos está mais próxima de 10:1 a 30:1. A "dieta mediterrânea", que tem sido associada com a diminuição do risco de doenças cardíacas, é mais rica em AGPI ômega-3, obtidos em vegetais folhosos (saladas) e óleos de peixe. Esses óleos são especialmente ricos em EPA e DHA, e suplementos com óleo de peixe são frequentemente prescritos para indivíduos com histórico de doença cardiovascular. ■

As propriedades físicas dos ácidos graxos, e dos compostos que os contêm, são determinadas em grande parte pelo comprimento e pelo grau de insaturação da cadeia hidrocarbonada. A cadeia hidrocarbonada apolar é responsável pela baixa solubilidade dos ácidos graxos na água. O ácido láurico (12:0, $M_r$ 200), por exemplo, tem solubilidade em água de 0,063 mg/g – muito menor do que a da glicose ($M_r$ 180), que é de 1.100 mg/g. Quanto mais longa for a cadeia acila do ácido graxo e quanto menos ligações duplas ela tiver, mais baixa é a solubilidade em água. O grupo ácido carboxílico é polar (e ionizado em pH neutro) e conta para a pequena solubilidade dos ácidos graxos de cadeia curta em água.

Os pontos de fusão também são muito influenciados pelo comprimento e grau de insaturação da cadeia hidrocarbonada. À temperatura ambiente (25°C), os ácidos graxos saturados de 12:0 a 24:0 têm consistência de cera, enquanto os ácidos graxos insaturados de mesmo comprimento são líquidos oleosos. Essa diferença nos pontos de fusão deve-se a diferentes graus de empacotamento das moléculas dos ácidos graxos (**Figura 10-2**). Nos compostos completamente saturados, a rotação livre em torno de cada ligação carbono-carbono dá grande flexibilidade à cadeia hidrocarbonada; a conformação mais estável é a forma completamente estendida, na qual o impedimento estérico dos átomos vizinhos é minimizado. Essas moléculas podem agrupar-se de forma compacta em arranjos quase cristalinos, com os átomos ao longo de todo o seu comprimento em interações de van der Waals com os átomos de moléculas vizinhas. Em ácidos graxos insaturados, uma ligação dupla *cis* força uma dobra na cadeia hidrocarbonada. Ácidos graxos com uma ou várias dessas dobras não podem agrupar-se tão firmemente quanto os ácidos graxos totalmente saturados, e as interações entre eles são, portanto, mais fracas. Como é necessário menos energia térmica para desordenar esses arranjos fracamente ordenados dos ácidos graxos insaturados, eles têm pontos de fusão consideravelmente mais baixos que os ácidos graxos saturados de mesmo comprimento de cadeia (Tabela 10-1).

Em vertebrados, os ácidos graxos livres (ácidos graxos não esterificados, com um grupo carboxilato livre) circulam no sangue ligados de modo não covalente a uma proteína carreadora, a albumina sérica. No entanto, os ácidos graxos estão presentes no plasma sanguíneo principalmente como derivados do ácido carboxílico, como ésteres ou amidas. Devido à ausência do grupo carboxilato carregado, esses derivados de ácidos graxos geralmente são ainda menos solúveis em água do que os ácidos graxos livres.

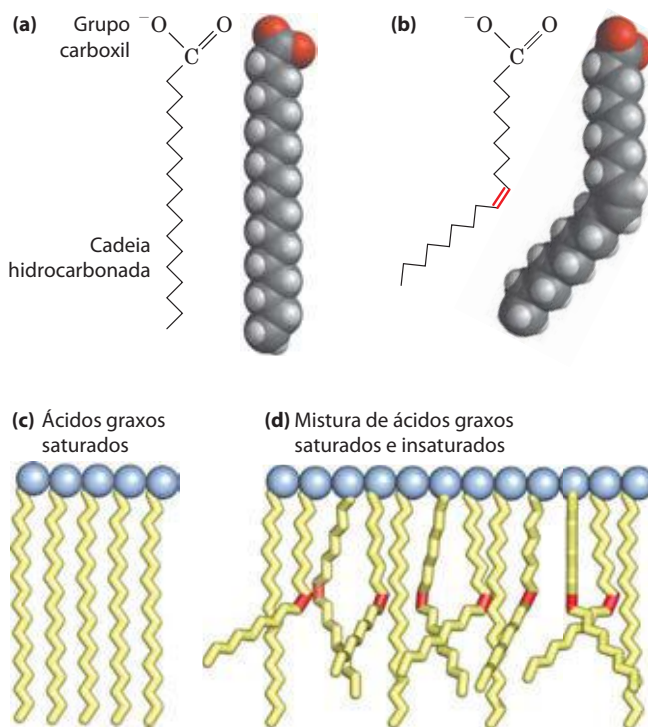



**FIGURA 10-2 O empacotamento de ácidos graxos em agregados estáveis.** A extensão do empacotamento depende do grau de saturação. **(a)** Duas representações do ácido esteárico completamente saturado, 18:0 (estearato em pH 7), em sua conformação normal estendida. **(b)** A ligação dupla *cis* (em vermelho) no ácido oleico, 18:1($\Delta^9$) (oleato), restringe a rotação e introduz uma dobra rígida na cauda hidrocarbonada. Todas as outras ligações na cadeia estão livres para rotação. **(c)** Os ácidos graxos completamente saturados na forma estendida empacotam-se em arranjos quase cristalinos, estabilizados por muitas interações hidrofóbicas. **(d)** A presença de um ou mais ácidos graxos com ligações duplas *cis* (em vermelho) interfere nesse agrupamento compacto e resulta em agregados menos estáveis.

## Os triacilgliceróis são ésteres de ácidos graxos do glicerol

Os lipídeos mais simples construídos a partir de ácidos graxos são os **triacilgliceróis**, também chamados de triglicerídeos, gorduras ou gorduras neutras. Os triacilgliceróis são compostos por três ácidos graxos, cada um em ligação éster com uma molécula de glicerol (**Figura 10-3**). Aqueles que contêm o mesmo tipo de ácido graxo em todas as três posições são chamados de triacilgliceróis simples, e sua nomenclatura é derivada do ácido graxo que contêm. Os triacilgliceróis simples de 16:0, 18:0 e 18:1, por exemplo, são tripalmitina, triestearina e trioleína, respectivamente. A maioria dos triacilgliceróis de ocorrência natural é mista, pois contém dois ou três ácidos graxos diferentes. Para dar nome a esses compostos sem gerar ambiguidade, o nome e a posição de cada ácido graxo devem ser especificados.

Como as hidroxilas polares do glicerol e os carboxilatos polares dos ácidos graxos estão em ligações éster, os triacilgliceróis são moléculas apolares, hidrofóbicas, essencialmente insolúveis em água. Os lipídeos têm densidades específicas mais baixas do que a água, o que explica por que as misturas de óleo e água (p. ex., tempero de salada com azeite e vinagre) têm duas fases: o óleo, com densidade específica mais baixa, flutua sobre a fase aquosa.

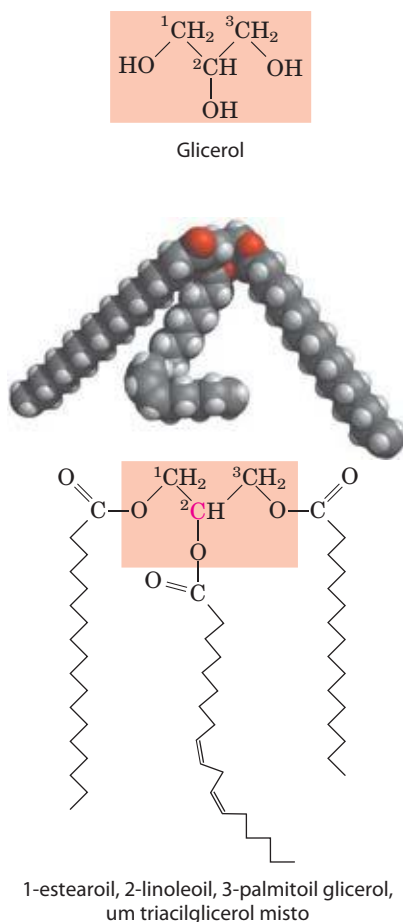



**FIGURA 10-3 O glicerol e um triacilglicerol.** O triacilglicerol misto mostrado aqui tem três ácidos graxos diferentes ligados à cadeia do glicerol. Quando o glicerol apresenta ácidos graxos diferentes em C-1 e C-3, o C-2 é um centro quiral (p. 17).

## Os triacilgliceróis armazenam energia e proporcionam isolamento térmico

Na maioria das células eucarióticas, os triacilgliceróis formam uma fase separada de gotículas microscópicas de óleo no citosol aquoso, servindo como depósitos de combustível metabólico. Em vertebrados, os adipócitos (células especializadas) armazenam grandes quantidades de triacilgliceróis em gotículas de gordura que quase preenchem a célula (**Figura 10-4a**). Os triacilgliceróis também são armazenados como óleos nas sementes de vários tipos de plantas, fornecendo energia e precursores biossintéticos durante a germinação da semente (Figura 10-4b). Os adipócitos e as sementes em germinação contêm **lipases**, enzimas que catalisam a hidrólise dos triacilgliceróis armazenados, liberando ácidos graxos para serem transportados para os locais onde são necessários como combustível.

Existem duas vantagens significativas em se usar triacilgliceróis para o armazenamento de combustível em vez de polissacarídeos, como o glicogênio e o amido. Primeiro, os átomos de carbono dos ácidos graxos estão mais reduzi-

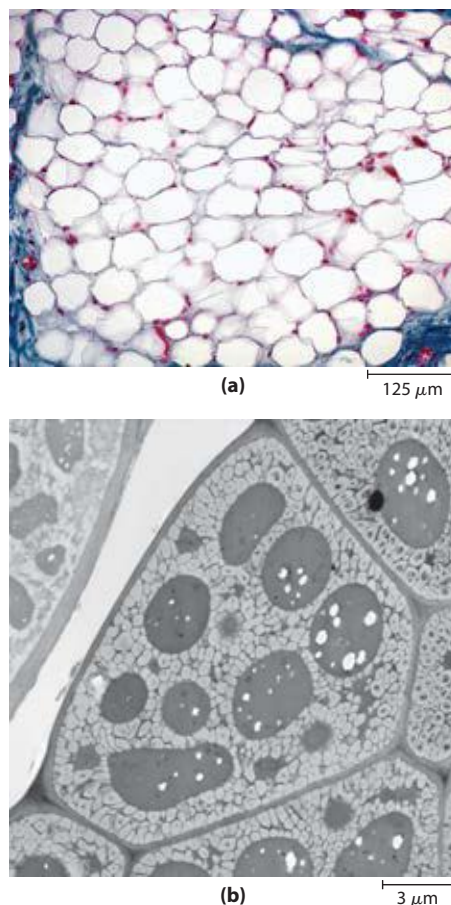



**FIGURA 10-4 Depósitos de gordura nas células.** **(a)** Secção transversal de tecido adiposo branco de humanos. Cada célula contém uma gotícula de gordura (branco) tão grande que espreme o núcleo (corado em vermelho) contra a membrana plasmática. **(b)** Secção transversal de uma célula de cotilédone de uma semente da planta *Arabidopsis*. As estruturas grandes e escuras são corpos proteicos, que estão rodeados por gordura de armazenamento nos corpos oleosos, de coloração clara.

dos do que os dos açúcares, e a oxidação de um grama de triacilgliceróis libera mais do que o dobro de energia do que a oxidação de um grama de carboidratos. Segundo, como os triacilgliceróis são hidrofóbicos e, portanto, não hidratados, o organismo que carrega gordura como combustível não precisa carregar o peso extra da água da hidratação que está associada aos polissacarídeos armazenados (2 g por grama de polissacarídeo). Os seres humanos apresentam tecido adiposo (composto principalmente por adipócitos) sob a pele, na cavidade abdominal e nas glândulas mamárias. As pessoas moderadamente obesas, com 15 a 20 kg de triacilgliceróis depositados em seus adipócitos, poderiam suprir suas necessidades energéticas por meses utilizando seus depósitos de gordura. Em contrapartida, o corpo humano consegue armazenar na forma de glicogênio menos do que a quantidade de energia utilizada em um dia. Os carboidratos, como a glicose, oferecem certas vantagens como fontes rápidas de energia metabólica, uma das quais é a sua solubilidade imediata em água. Em alguns animais, os triacilgliceróis armazenados sob a pele servem tanto de estoques de energia quanto de isolamento contra baixas temperaturas. Focas, morsas, pinguins e outros animais polares de sangue quente apresentam sua superfície amplamente coberta por triacilgliceróis. Em animais hibernantes, como os ursos, as enormes reservas de energia acumuladas antes da hibernação servem para dois propósitos: isolamento térmico e reserva de energia (ver Quadro 17-1).

## A hidrogenação parcial dos óleos de cozinha produz ácidos graxos *trans*

A maioria das gorduras naturais, como as dos óleos vegetais, dos laticínios e da gordura animal, são misturas complexas de triacilgliceróis simples e mistos, que contêm uma variedade de ácidos graxos que diferem no comprimento da cadeia e no grau de saturação (**Figura 10-5**). Os óleos vegetais, como o óleo de milho e o azeite de oliva,

**FIGURA 10-5 Composição de ácidos graxos de três gorduras alimentares.** Azeite de oliva, manteiga e gordura da carne bovina consistem em misturas de triacilgliceróis, diferindo em sua composição de ácidos graxos. Os pontos de fusão dessas gorduras – e, portanto, o seu estado físico à temperatura ambiente (25°C) – variam de acordo com sua composição de ácidos graxos. O azeite de oliva tem uma alta proporção de ácidos graxos insaturados de cadeia longa ($C_{16}$ e $C_{18}$), o que explica seu estado líquido a 25°C. A maior proporção de ácidos graxos saturados de cadeia longa ($C_{16}$ e $C_{18}$) na manteiga aumenta seu ponto de fusão, então a manteiga é um sólido mole à temperatura ambiente. A gordura da carne bovina, com uma proporção ainda maior de ácidos graxos saturados de cadeia longa, é um sólido duro.

são compostos em grande parte por triacilgliceróis com ácidos graxos insaturados e, portanto, são líquidos à temperatura ambiente. Os triacilgliceróis que contêm somente ácidos graxos saturados, como a triestearina, o componente mais importante da gordura da carne bovina, são sólidos brancos e gordurosos à temperatura ambiente.

Quando alimentos ricos em lipídeos são expostos por muito tempo ao oxigênio do ar, eles podem estragar e tornarem-se rançosos. O gosto e o cheiro desagradáveis associados à rancidez resultam da clivagem oxidativa das ligações duplas em ácidos graxos insaturados, que produz aldeídos e ácidos carboxílicos de menor comprimento de cadeia e, portanto, de maior volatilidade; esses compostos se dispersam prontamente pelo ar até o seu nariz. Para aumentar o prazo de validade de óleos vegetais de cozinha e para aumentar a sua estabilidade às altas temperaturas utilizadas na fritura, os óleos vegetais são preparados por hidrogenação parcial. Esse processo converte muitas das ligações duplas *cis* dos ácidos graxos em ligações simples e aumenta o ponto de fusão dos óleos, de forma que eles ficam mais próximos do estado sólido à temperatura ambiente (a margarina é produzida assim, a partir de óleo vegetal). A hidrogenação parcial tem outro efeito indesejado: algumas ligações duplas *cis* são convertidas em ligações duplas *trans*. Hoje existem fortes evidências de que o consumo de ácidos graxos *trans* pela dieta (frequentemente chamados de "gorduras *trans*") leva a uma maior incidência de doenças cardiovasculares e que evitar essas gorduras na dieta reduz consideravelmente o risco de doenças cardíacas. Os ácidos graxos *trans* da dieta aumentam o nível de triacilgliceróis e de colesterol LDL (o colesterol "ruim") no sangue e diminuem o nível de colesterol HDL (o colesterol "bom"). Essas mudanças por si só são suficientes para aumentar o risco de doenças cardíacas, mas podem ter mais efeitos adversos. Parecem, por exemplo, aumentar a resposta inflamatória do corpo, o que é outro fator de risco para doenças cardíacas. (Ver no Capítulo 21 uma descrição do colesterol LDL e HDL – lipoproteína de baixa e de alta densidade – e seus efeitos na saúde.)

Muitos alimentos em *fast-foods* são fritos em óleos vegetais parcialmente hidrogenados e, portanto, contêm altos níveis de ácidos graxos *trans* (Tabela 10-2). Em vista dos efeitos prejudiciais dessas gorduras, alguns países (Dinamarca) e algumas cidades (Nova York e Filadélfia) restringiram com severidade o uso de óleos parcialmente hidrogenados em restaurantes. Batatas fritas preparadas em restaurantes de *fast-food* na Dinamarca agora contêm quantidades quase indetectáveis de ácidos graxos *trans*, enquanto o mesmo produto preparado nos Estados Unidos contém de 5 a 10 g de ácidos graxos *trans* por porção (Tabela 10-2). Os efeitos deletérios das gorduras *trans* ocorrem no consumo de 2 a 7 g/dia (20 a 60 kcal no consumo calórico diário de 2.000 kcal; note que uma caloria nutricional é equivalente à quilocaloria usada por químicos e bioquímicos, então uma dieta de 2.000 calorias é equivalente a uma dieta de 2.000 kcal). Uma única porção de batatas fritas em um restaurante estadunidense pode conter essa quantidade de ácidos graxos *trans*! Muitos outros alimentos prontos, assados e lanches nas prateleiras de supermercados contêm níveis comparativamente altos de ácidos graxos *trans*. ■

**TABELA 10-2** Ácidos graxos *trans* em alguns *fast-foods* e lanches

| | Conteúdo de ácidos graxos *trans* | |
|---|---|---|
| | **Em uma porção típica (g)** | **Em % de ácidos graxos totais** |
| Batatas fritas | 4,7-6,1 | 28-36 |
| Hambúrguer de peixe empanado | 5,6 | 28 |
| *Nuggets* de frango empanados | 5,0 | 25 |
| Pizza | 1,1 | 9 |
| Salgadinhos de milho | 1,6 | 22 |
| Sonho | 2,7 | 25 |
| *Muffin* | 0,7 | 14 |
| Barra de chocolate | 0,2 | 2 |

**Fonte**: Adaptada da Tabela 1 em Mozaffarian, D., Katan, M.B., Ascherio, P.H., Stampfer, M.J., & Willet, W.C. (2006). Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1604-1605.
**Nota**: Dados para alimentos preparados com óleo vegetal parcialmente hidrogenado nos Estados Unidos em 2002.

$$\underbrace{CH_3(CH_2)_{14}-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}}_{\text{Ácido palmítico}}-O-\underbrace{CH_2-(CH_2)_{28}-CH_3}_{\text{1-Triacontanol}}$$

**(a)**

**(b)**

**FIGURA 10-6 Cera biológica. (a)** Triacontanoilpalmitato, o principal componente da cera de abelha, é um éster de ácido palmítico com o álcool triacontanol. **(b)** Favo de mel, construído com cera de abelha, firme a 25°C e completamente impermeável à água.

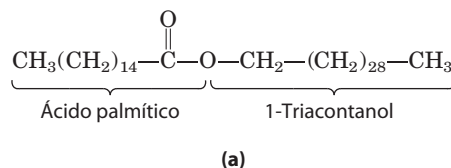
## As ceras servem como reservas de energia e como impermeabilizantes à água

As ceras biológicas são ésteres de ácidos graxos saturados e insaturados de cadeia longa ($C_{14}$ a $C_{36}$) com alcoóis de cadeia longa ($C_{16}$ a $C_{30}$) (**Figura 10-6**). Seus pontos de fusão (60 a 100°C) geralmente são mais altos do que os dos triacilgliceróis. No plâncton, microrganismos de vida livre na base da cadeia alimentar dos animais marinhos, as ceras são a principal forma de armazenamento de combustível metabólico.

As ceras também servem para uma diversidade de outras funções relacionadas às suas propriedades impermeabilizantes e sua consistência firme. Certas glândulas da pele de vertebrados secretam ceras para proteger os pelos e a pele e mantê-los flexíveis, lubrificados e impermeáveis. As aves, particularmente as aquáticas, secretam ceras por suas glândulas uropigiais para manter suas penas impermeáveis à água. As folhas lustrosas do azevinho, do rododendro, da hera venenosa e de muitas outras plantas tropicais são cobertas por uma camada grossa de ceras, que impede a evaporação excessiva de água e as protege contra parasitas.

As ceras biológicas têm várias aplicações em indústrias como a farmacêutica e a cosmética, entre outras. A lanolina (da lã de cordeiro), a cera de abelhas (Figura 10-6), a cera de carnaúba (palmeira brasileira) e a cera extraída do óleo do cachalote (espécie de baleia) são amplamente utilizadas na manufatura de loções, pomadas e polidores.

### RESUMO 10.1 Lipídeos de armazenamento

- Os lipídeos são componentes celulares insolúveis em água, de estruturas diversas, que podem ser extraídos dos tecidos por solventes apolares.
- Quase todos os ácidos graxos, os componentes hidrocarbonados de muitos lipídeos, têm um número par de átomos de carbono (geralmente 12 a 24); eles são saturados ou insaturados, com ligações duplas quase sempre na configuração *cis*.
- Os triacilgliceróis contêm três moléculas de ácidos graxos esterificadas aos três grupos hidroxila do glicerol. Os triacilgliceróis simples contêm somente um tipo de ácido graxo; os mistos contêm dois ou três tipos. Eles são principalmente gorduras de reserva, estando presentes em muitos alimentos.
- A hidrogenação parcial de óleos vegetais na indústria alimentícia converte algumas ligações duplas *cis* para a configuração *trans*. Ácidos graxos *trans* na dieta são um importante fator de risco para doenças cardíacas coronarianas.

## 10.2 Lipídeos estruturais em membranas

A característica central na arquitetura das membranas biológicas é uma dupla camada de lipídeos que atua como barreira à passagem de moléculas polares e íons. Os lipídeos de membrana são anfipáticos: uma extremidade da molécula é hidrofóbica e a outra é hidrofílica. Suas interações hidrofóbicas entre si e suas interações hidrofílicas com a água direcionam o seu empacotamento em camadas, chamadas de bicamadas de membrana. Esta seção descreve cinco tipos gerais de lipídeos de membrana: glicerofosfolipídeos, nos quais as regiões hidrofóbicas são compostas por dois ácidos graxos ligados ao glicerol; galactolipídeos e sulfolipídeos, que também contêm dois ácidos graxos esterificados com o

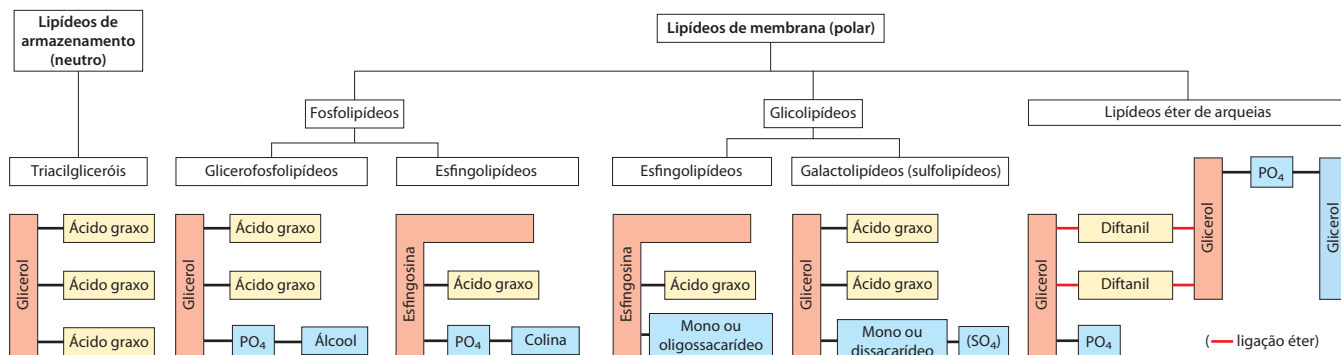



**FIGURA 10-7 Alguns tipos comuns de lipídeos de armazenamento e de membrana.** Todos os tipos de lipídeos representados aqui têm ou glicerol ou esfingosina como esqueleto (em cor salmão), ao qual estão ligados um ou mais grupos alquila de cadeia longa (em amarelo) e um grupo cabeça polar (em azul). Em triacilgliceróis, glicerofosfolipídeos, galactolipídeos e sulfolipídeos, os grupos alquilas são ácidos graxos em ligação éster. Os esfingolipídeos contêm um único ácido graxo em ligação amida com o esqueleto de esfingosina. Os lipídeos de membrana de arqueias são variáveis; aqueles representados aqui têm duas cadeias alquilas muito longas e ramificadas, cada extremidade em ligação éter com a porção glicerol. Nos fosfolipídeos, o grupo cabeça polar está unido por meio de ligação fosfodiéster, enquanto os glicolipídeos têm uma ligação glicosídica direta entre o açúcar do grupo cabeça e o esqueleto de glicerol.

glicerol, mas não apresentam os fosfatos característicos dos fosfolipídeos; lipídeos tetraéter em arqueia, nos quais duas cadeias muito longas de alquilas estão unidas por ligação éter ao glicerol em ambas as extremidades; esfingolipídeos, nos quais um único ácido graxo está ligado a uma amina graxa, a esfingosina; e esteróis, compostos caracterizados por um sistema rígido de quatro anéis hidrocarbonados fusionados.

As porções hidrofílicas nesses compostos anfipáticos podem ser tão simples quanto um único grupo –OH em uma extremidade do sistema de anéis do esterol, ou podem ser bem mais complexas. Nos glicerofosfolipídeos e alguns esfingolipídeos, o grupo cabeça polar está unido à porção hidrofóbica por uma ligação fosfodiéster; esses são os **fosfolipídeos**. Outros esfingolipídeos não apresentam fosfato, mas têm um açúcar simples ou um oligossacarídeo complexo em suas extremidades polares; esses são os **glicolipídeos** (**Figura 10-7**). Nesses grupos de lipídeos de membrana, uma enorme diversidade resulta de várias combinações de "caudas" de ácidos graxos e "cabeças" polares. O arranjo desses lipídeos nas membranas e seus papéis estruturais e funcionais são considerados no próximo capítulo.

## Os glicerofosfolipídeos são derivados do ácido fosfatídico

Os **glicerofosfolipídeos**, também chamados de fosfoglicerídeos, são lipídeos de membrana nos quais dois ácidos graxos estão unidos por ligação éster ao primeiro e ao segundo carbono do glicerol e um grupo fortemente polar ou carregado está unido por ligação fosfodiéster ao terceiro carbono. O glicerol é pró-quiral: não apresenta carbonos assimétricos, mas a ligação de fosfato a uma extremidade converte-o em um composto quiral, que pode ser chamado corretamente de L-glicerol-3-fosfato, D-glicerol-1-fosfato, ou *sn*-glicerol-3-fosfato (**Figura 10-8**). Os glicerofosfolipídeos são denominados como derivados do composto precursor, o ácido fosfatídico (**Figura 10-9**), de acordo com o álcool polar no grupo cabeça. A fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina têm colina e etanolamina como grupos cabeça polares, por exemplo. Em todos esses compostos, o grupo cabeça está unido ao glicerol por uma ligação fosfodiéster, na qual o grupo fosfato tem carga negativa em pH neutro. O álcool polar pode estar carregado negativamente (assim como no fosfatidilinositol-4,5-bifosfato), neutro (fosfatidilserina), ou carregado positivamente (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina). Como será visto no Capítulo 11, essas cargas contribuem de modo significativo para as propriedades de superfície das membranas.

Como os ácidos graxos nos glicerofosfolipídeos podem ser qualquer um de uma ampla variedade, um dado fosfolipídeo (p.ex., fosfatidilcolina) pode consistir em várias

L-glicerol-3-fosfato (*sn*-glicerol-3-fosfato)

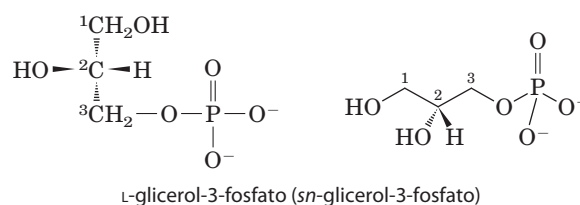



**FIGURA 10-8 L-Glicerol-3-fosfato, o esqueleto dos fosfolipídeos.** O glicerol por si só não é quiral, visto que ele tem um plano de simetria através de C-2. No entanto, o glicerol é pró-quiral – pode ser convertido em um composto quiral por adição de um substituinte como o fosfato a qualquer um dos grupos $–CH_2OH$. Uma nomenclatura não ambígua para o glicerol fosfato é o sistema D, L (descrito na p. 78), no qual os isômeros são denominados de acordo com suas relações estereoquímicas aos isômeros do gliceraldeído. Por este sistema, o estereoisômero do glicerol-fosfato encontrado na maioria dos lipídeos é corretamente denominado L-glicerol-3-fosfato ou D-glicerol-1-fosfato. Outra forma para especificar estereoisômeros é o sistema *sn* (número estereoespecífico), no qual C-1 é, por definição, o grupo do composto pró-quiral que ocupa a posição pró-S. A forma comum de glicerol-fosfato em fosfolipídeos é, por esse sistema, *sn*-glicerol-3-fosfato (e que C-2 está na configuração R). Em arqueias, o glicerol nos lipídeos está na outra configuração; ou seja, D-glicerol-3-fosfato.

| Nome do glicerofosfolipídeo | Nome do X—O | Fórmula do grupo X | Carga líquida (em pH 7) |
|---|---|---|---|
| Ácido fosfatídico | — | — H | −2 |
| Fosfatidiletanolamina | Etanolamina | $\overset{+}{N}H_3$ | 0 |
| Fosfatidilcolina | Colina | N | 0 |
| Fosfatidilserina | Serina | H, O, $O^-$, $\overset{+}{N}H_3$ | −1 |
| Fosfatidilglicerol | Glicerol | HO, H, OH | −1 |
| Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato | *mio*-inositol-4,5-bisfosfato | HO, OH, $OPO_3^{2-}$, $OPO_3^{2-}$, OH | −4* |
| Cardiolipina | Fosfatidilglicerol | HO, H, O, P, $R^2$, $R^1$, $O^-$ | −2 |

**FIGURA 10-9 Glicerofosfolipídeos.** Os glicerofosfolipídeos comuns são diacilgliceróis ligados a grupos álcool por ligação fosfodiéster. O ácido fosfatídico, um fosfomonoéster, é o composto precursor. Cada derivado é denominado de acordo com o grupo álcool (X) cabeça, com o prefixo "fosfatidil-". Na cardiolipina, dois ácidos fosfatídicos compartilham um único glicerol ($R^1$ e $R^2$ são grupos acil graxos). * Observe que cada um dos ésteres de fosfato no fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato tem uma carga de cerca de −1,5; um de seus grupos –OH está apenas parcialmente ionizado em pH 7,0.

espécies moleculares, cada qual com seu complemento único de ácidos graxos. A distribuição de espécies moleculares é específica para diferentes organismos, diferentes tecidos do mesmo organismo e diferentes glicerofosfolipídeos na mesma célula ou tecido. Em geral, os glicerofosfolipídeos contêm um ácido graxo saturado $C_{16}$ ou $C_{18}$ em C-1 e um ácido graxo insaturado $C_{18}$ ou $C_{20}$ em C-2. Com poucas exceções, o significado biológico da variação dos ácidos graxos e dos grupos cabeça ainda não está compreendido.

## Alguns glicerofosfolipídeos têm ácidos graxos em ligação éter

Alguns tecidos animais e organismos unicelulares são ricos em **lipídeos éter**, nos quais uma das duas cadeias de acila está unida ao glicerol em ligação éter em vez de éster. A cadeia com ligação éter pode ser saturada, como nos lipídeos éter de alquila, ou pode conter uma ligação dupla entre C-1 e C-2, como nos **plasmalogênios** (**Figura 10-10**). O tecido cardíaco de vertebrados é especialmente rico em lipídeos

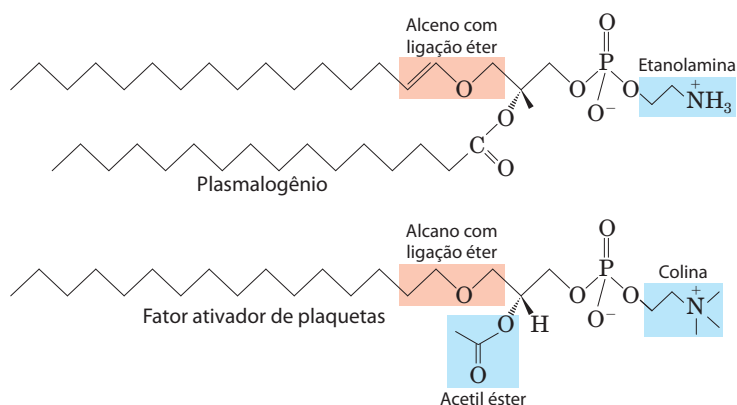



**FIGURA 10-10 Lipídeos éter.** Os plasmalogênios têm uma cadeia alquenila em ligação éter, em que a maioria dos glicerofosfolipídeos tem um ácido graxo em ligação éster (compare com a Figura 10-9). O fator ativador de plaquetas tem uma longa cadeia de alquila em ligação éter no C-1 do glicerol, mas C-2 está em ligação éster com ácido acético, o que torna o composto muito mais hidrossolúvel que a maioria dos glicerofosfolipídeos e plasmalogênios. O grupo álcool cabeça é a etanolamina nos plasmalogênios e a colina no fator ativador de plaquetas.

éter; cerca de metade dos fosfolipídeos do coração é plasmalogênio. As membranas de bactérias halofílicas, protistas ciliados, e de certos invertebrados também contêm altas proporções de lipídeos éter. O significado funcional dos lipídeos éter nessas membranas é desconhecido; talvez sua resistência às fosfolipases que clivam ácidos graxos com ligação éster de lipídeos de membrana seja importante em alguns casos.

Ao menos um lipídeo éter, o **fator ativador de plaquetas**, é um potente sinalizador molecular. Ele é liberado de leucócitos chamados basófilos e estimula a agregação de plaquetas e a liberação de serotonina (um vasoconstritor) das plaquetas. Também exerce vários efeitos no fígado, no músculo liso, no coração, nos tecidos uterinos e pulmonares, desempenhando também um importante papel na inflamação e na resposta alérgica. ■

## Os cloroplastos contêm galactolipídeos e sulfolipídeos

O segundo grupo de lipídeos de membrana é aquele que predomina nas células vegetais: os **galactolipídeos**, nos quais um ou dois resíduos de galactose estão conectados por uma ligação glicosídica ao C-3 de um 1,2-diacilglicerol (**Figura 10-11**; ver também Figura 10-7). Os galactolipídeos estão localizados nas membranas dos tilacoides (membranas internas) dos cloroplastos; eles compõem de 70 a 80% do total dos lipídeos de membrana de uma planta vascular e são, provavelmente, os lipídeos de membrana mais abundantes na biosfera. O fosfato frequentemente é o nutriente limitante das plantas no solo; talvez a pressão evolutiva para conservar fosfato para papéis mais críticos tenha favorecido as plantas que produzem lipídeos sem fosfato. As membranas das plantas também contêm sulfolipídeos, nos quais um resíduo de glicose sulfonado está unido a um diacilglicerol em ligação glicosídica. O grupo sulfonato apresenta uma carga negativa como aquela do grupo fosfato em fosfolipídeos.

## Arqueias contêm lipídeos de membrana únicos

Algumas arqueias que vivem em nichos ecológicos em condições extremas – altas temperaturas (água em ebulição), baixo pH, alta força iônica, por exemplo – têm lipídeos de membrana que contêm hidrocarbonetos de cadeia longa (32 carbonos) ramificada, ligados em cada extremidade ao glicerol (**Figura 10-12**) por meio de ligações éter, muito mais estáveis à hidrólise em pH baixo e à alta temperatura do que as ligações éster encontradas nos lipídeos das bactérias e dos eucariotos. Em sua fórmula completamente estendida, os lipídeos éster de arqueias apresentam o dobro do comprimento dos fosfolipídeos e esfingolipídeos e podem transpassar a largura total da membrana plasmática. Em

Monogalactosildiacilglicerol (MGDG)

Digalactosildiacilglicerol (DGDG)

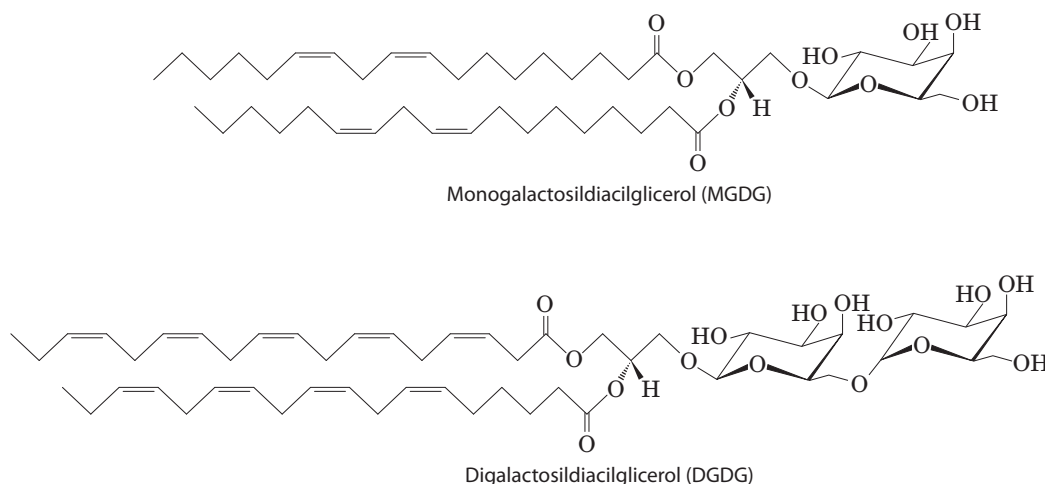



**FIGURA 10-11 Dois galactolipídeos de membrana dos tilacoides de cloroplasto.** Nos monogalactosildiacilgliceróis (MGDG) e digalactosildiacilgliceróis (DGDG), os grupos acilas estão polinsaturados e os grupos-cabeça são não carregados.

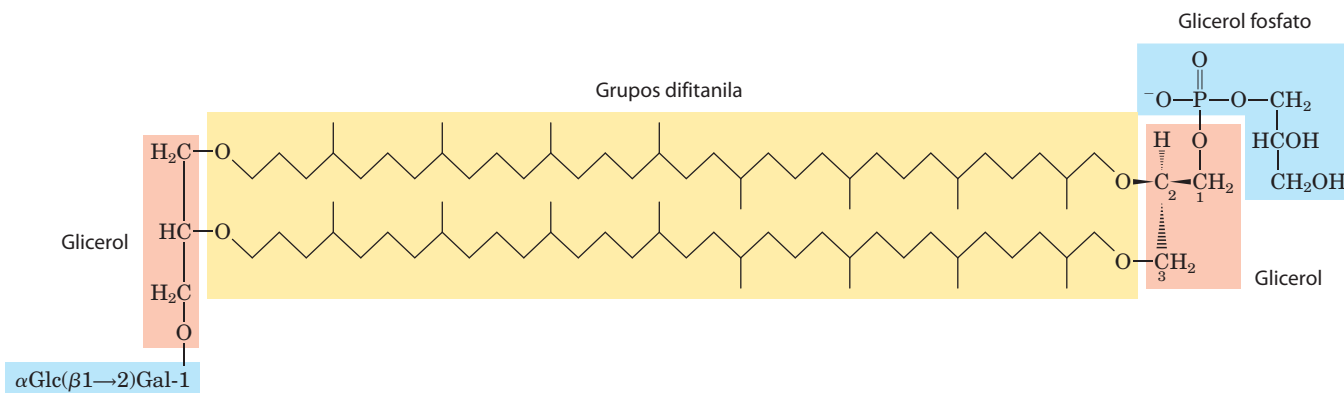



**FIGURA 10-12 Um lipídeo de membrana atípico, encontrado apenas em algumas arqueias.** Neste lipídeo difitanila tetraéter, as porções difitanilas (em amarelo) são hidrocarbonetos longos compostos por oito grupos isopreno de cinco carbonos condensados extremidade a extremidade (sobre a condensação de unidades isopreno, ver Figura 21-36; também, compare os grupos difitanilas com as cadeias laterais de fitóis de 20 carbonos das clorofilas na Figura 19-49a). Nesta forma estendida, os grupos difitanila são aproximadamente duas vezes maiores do que o comprimento de um ácido graxo de 16 carbonos geralmente encontrado nos lipídeos de membrana das bactérias e dos eucariotos. As porções de glicerol nos lipídeos de arqueias estão na configuração R, ao contrário das bactérias e dos eucariotos, que têm configuração S. Os lipídeos de arqueias diferem nos substituintes dos gliceróis. Na molécula aqui representada, um glicerol está ligado ao dissacarídeo $\alpha$-glicopiranosil-(1 → 2)-$\beta$-galactofuranose; o outro glicerol está ligado a um grupo glicerol-fosfato.

cada extremidade da molécula estendida há um grupo polar que consiste em glicerol ligado a fosfato ou a resíduos de açúcar. O nome geral desses compostos, glicerol-dialquil-glicerol-tetraéteres (GDGT), reflete sua estrutura única. A porção glicerol dos lipídeos das arqueias não é o mesmo estereoisômero dos lipídeos de bactérias e de eucariotos; o carbono central está na configuração R em arqueias e na configuração S em bactérias e eucariotos (Figura 10-8).

## Os esfingolipídeos são derivados da esfingosina

Os **esfingolipídeos**, a quarta grande classe de lipídeos de membrana, também têm um grupo cabeça polar e duas caudas apolares; contudo, ao contrário dos glicerofosfolipídeos e galactolipídeos, não contêm glicerol. Os esfingolipídeos são compostos por uma molécula de aminoálcool, esfingosina, de cadeia longa (também chamada de 4-esfingenina) ou um de seus derivados, uma molécula de um ácido graxo de cadeia longa e um grupo polar unido por uma ligação glicosídica, em alguns casos, e uma ligação fosfodiéster em outros (**Figura 10-13**).

Os carbonos C-1, C-2 e C-3 da molécula de esfingosina são estruturalmente análogos aos três carbonos do glicerol nos glicerofosfolipídeos. Quando um ácido graxo é unido em ligação amida ao $-NH_2$ no C-2, o composto resultante é uma **ceramida**, estruturalmente similar ao diacilglicerol. A ceramida é o precursor estrutural de todos os esfingolipídeos.

Há três subclasses de esfingolipídeos, todos derivados da ceramida, mas diferindo em seus grupos cabeça: esfingomielinas, glicolipídeos neutros (não carregados) e gangliosídeos. As **esfingomielinas** contêm fosfocolina ou fosfoetanolamina como grupo cabeça polar, sendo assim classificadas junto com os glicerofosfolipídeos como fosfolipídeos (Figura 10-7). Realmente, as esfingomielinas se parecem com as fosfatidilcolinas em suas propriedades gerais e na estrutura tridimensional e por não terem carga líquida em seus grupos cabeça (**Figura 10-14**). As esfingomielinas, presentes nas membranas plasmáticas das células animais, são especialmente proeminentes na mielina, bainha membranosa que envolve e isola os axônios de alguns neurônios – daí o nome esfingomielinas.

Os **glicoesfingolipídeos**, que ocorrem amplamente na face externa das membranas plasmáticas, possuem grupos cabeça com um ou mais açúcares conectados diretamente ao –OH no C-1 da porção ceramida; eles não contêm fosfato. Os **cerebrosídeos** têm um único açúcar ligado à ceramida; os que têm galactose são caracteristicamente encontrados nas membranas plasmáticas das células em tecido neural, e os que têm glicose nas membranas plasmáticas das células, em tecidos não neurais. Os **globosídeos** são glicoesfingolipídeos com dois ou mais açúcares, geralmente D-glicose, D-galactose, ou *N*-acetil-D-galactosamina. Os cerebrosídeos e globosídeos são às vezes chamados de **glicolipídeos neutros**, pois não têm carga em pH 7.

Os **gangliosídeos**, os esfingolipídeos mais complexos, têm oligossacarídeos como grupo cabeça polar e um ou mais resíduos do ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac), um ácido siálico (frequentemente chamado apenas de “ácido siálico”), nas terminações. O ácido siálico dá aos gangliosídeos a carga negativa em pH 7 que os distingue dos globosídeos. Os gangliosídeos com um resíduo de ácido siálico estão na série GM (*M* de mono-), os com dois estão na série GD (*D* de di-) e assim por diante (GT, três resíduos de ácido siálico; GQ, quatro).

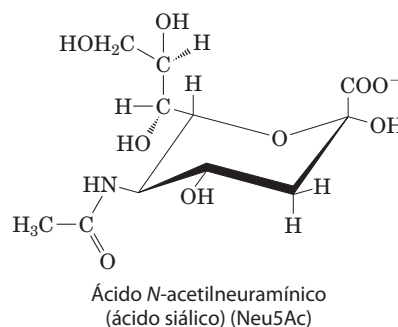
Ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico) (Neu5Ac)

Johann Thudichum, 1829–1901

**FIGURA 10-13 Esfingolipídeos.** Os três primeiros carbonos na extremidade polar da esfingosina são análogos aos três carbonos do glicerol nos glicerofosfolipídeos. O grupo amino em C-2 apresenta um ácido graxo em ligação amida. O ácido graxo geralmente é saturado ou monoinsaturado, com 16, 18, 22 ou 24 átomos de carbono. A ceramida é o composto precursor para esse grupo. Os outros esfingolipídeos diferem no grupo polar da cabeça (X), ligado em C-1. Os gangliosídeos têm grupos de oligossacarídeos muito complexos. Os símbolos padrão para os açúcares são usados nesta figura, como mostra a Tabela 7-1.

## Os esfingolipídeos nas superfícies celulares são sítios de reconhecimento biológico

Quando os esfingolipídeos foram descobertos há mais de um século pelo médico e químico Johann Thudichum, o seu papel biológico parecia tão enigmático quanto a Esfinge, e ele os batizou em homenagem a esse monumento. Em humanos, pelo menos 60 esfingolipídeos diferentes foram identificados nas membranas celulares. Muitos são especialmente proeminentes na membrana plasmática dos neu-

Fosfatidilcolina

Fosfocolina

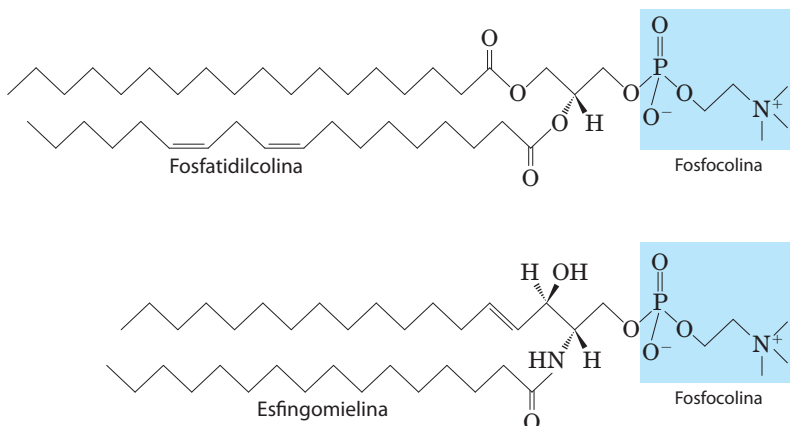
Esfingomielina

Fosfocolina

**FIGURA 10-14 As estruturas moleculares de duas classes semelhantes de lipídeos de membrana.** A fosfatidilcolina (glicerofosfolipídeo) e a esfingomielina (esfingolipídeo) possuem dimensões e propriedades físicas similares, mas, presumivelmente, exercem papéis diferentes nas membranas.

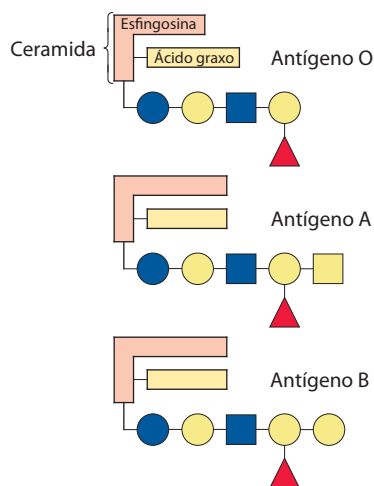



**FIGURA 10-15** **Glicoesfingolipídeos como determinantes dos grupos sanguíneos.** Os grupos sanguíneos humanos (O, A, B) são determinados em parte pelos grupos de oligossacarídeo da cabeça desses glicoesfingolipídeos. Os mesmos três oligossacarídeos também são encontrados ligados a certas proteínas do sangue de indivíduos dos tipos sanguíneos O, A e B, respectivamente. Os símbolos-padrão para açúcares são utilizados aqui (ver Tabela 7-1).

rônios e alguns são claramente sítios de reconhecimento na superfície celular, mas uma função específica para apenas alguns poucos esfingolipídeos já foi descoberta. As porções de carboidrato de certos esfingolipídeos definem os grupos sanguíneos humanos e, portanto, definem o tipo de sangue que os indivíduos podem receber seguramente nas transfusões sanguíneas (**Figura 10-15**).

Os gangliosídeos estão concentrados na superfície externa das células, onde apresentam pontos de reconhecimento para moléculas extracelulares ou superfícies de células vizinhas. Os tipos e as quantidades de gangliosídeos na membrana plasmática mudam consideravelmente durante o desenvolvimento embrionário. A formação de tumores induz a síntese de um novo complemento de gangliosídeos e descobriu-se que concentrações muito baixas de um gangliosídeo específico induzem a diferenciação de células neuronais tumorais em cultura. A investigação dos papéis biológicos de diversos gangliosídeos continua sendo uma área em desenvolvimento para pesquisas futuras.

## Os fosfolipídeos e os esfingolipídeos são degradados nos lisossomos

A maioria das células degrada e repõe seus lipídeos de membrana. Para cada ligação hidrolisável em um glicerofosfolipídeo, há uma enzima hidrolítica específica no lisossomo (**Figura 10-16**). As fosfolipases do tipo A removem um dos dois ácidos graxos, produzindo um lisofosfolipídeo. (Essas esterases não atacam a ligação éter dos plasmalogênios.) As lisofosfolipases removem o ácido graxo restante.

Os gangliosídeos são degradados por um conjunto de enzimas lisossomais que catalisam a remoção gradual das unidades de açúcar, produzindo finalmente uma ceramida. Um defeito genético em qualquer uma dessas enzimas hidrolíticas leva ao acúmulo de gangliosídeos na célula, com graves consequências médicas (Quadro 10-1).

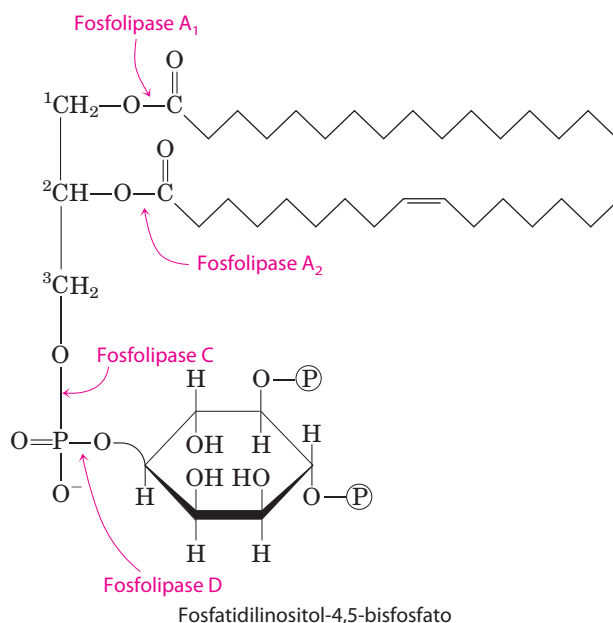



**FIGURA 10-16** **As especificidades das fosfolipases.** As fosfolipases $A_1$ e $A_2$ hidrolisam as ligações éster de glicerofosfolipídeos intactos nos carbonos C-1 e C-2 do glicerol, respectivamente. Quando um dos ácidos graxos é removido por uma fosfolipase do tipo A, o segundo ácido graxo é removido por uma lisofosfolipase (não mostrada). Cada uma das fosfolipases C e D rompe uma das ligações fosfodiéster no grupo cabeça. Algumas fosfolipases atuam em somente um tipo de glicerofosfolipídeo, como o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (mostrado aqui) ou a fosfatidilcolina; outras são menos específicas.

## Os esteróis têm quatro anéis de carbono fusionados

Os **esteróis** são lipídeos estruturais presentes nas membranas da maioria das células eucarióticas. A estrutura característica desse quinto grupo de lipídeos de membrana é o núcleo esteroide, que consiste em quatro anéis fusionados, três com seis carbonos e um com cinco (**Figura 10-17**). O núcleo esteroide é quase planar e é relativamente rígido; os anéis fusionados não permitem rotação em torno das ligações C–C. O **colesterol**, o principal esterol nos tecidos animais, é anfipático, com um grupo cabeça polar (o grupo hidroxila em C-3) e um "corpo" hidrocarbonado apolar (o núcleo esteroide e a cadeia lateral hidrocarbonada no C-17), tão longa quanto um ácido graxo de 16 carbonos em sua forma estendida. Es-

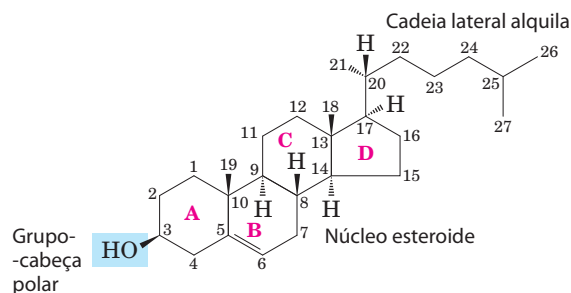



**FIGURA 10-17** **Colesterol.** Na estrutura química do colesterol, os anéis são denominados A a D para simplificar a referência aos derivados do núcleo esteroide; os átomos de carbono estão numerados em azul. O grupo hidroxila do C-3 (sombreado em azul) é o grupo cabeça polar. Para armazenar e transportar o esterol, esse grupo hidroxila se condensa com um ácido graxo para formar um éster de esterol.

## QUADRO 10-1  MEDICINA Acúmulos anormais de lipídeos de membrana: algumas doenças humanas herdadas

Os lipídeos polares das membranas sofrem constante renovação metabólica (*turnover*), e a sua taxa de síntese normalmente é contrabalançada por sua taxa de degradação. A degradação dos lipídeos é promovida por enzimas hidrolíticas nos lisossomos, sendo cada enzima capaz de hidrolisar uma ligação específica. Quando a degradação de esfingolipídeos é prejudicada por um defeito em uma dessas enzimas (Figura Q-1), os produtos da degradação parcial se acumulam nos tecidos, causando doenças graves.

Por exemplo, a doença de Niemann-Pick é causada por um defeito genético raro na enzima esfingomielinase, que cliva a fosfocolina da esfingomielina. A esfingomielina se acumula no encéfalo, no baço e no fígado. A doença se torna evidente em bebês e causa deficiência intelectual e morte prematura. Mais comum é a doença de Tay-Sachs, na qual o gangliosídeo GM2 se acumula no encéfalo e no baço (Figura Q-2) devido à falta da enzima hexosaminidase A. Os sintomas da doença de Tay-Sachs são retardo progressivo no desenvolvimento, paralisia, cegueira e morte até os 3 ou 4 anos de idade.

O aconselhamento genético pode prever e evitar muitas doenças hereditárias. Os testes nos futuros pais podem detectar enzimas anormais, então testes de DNA podem determinar a natureza exata do defeito e o risco que ele representa para os descendentes. Uma vez que ocorra a gravidez, as células fetais obtidas por amostra de parte da placenta (da vilosidade coriônica) ou do líquido amniótico (amniocentese) podem ser testadas.

Ceramida GM1
β-galactosidase — Gangliosidose generalizada
Ceramida GM2
Hexosaminidase A — Doença de Tay-Sachs
Ceramida GM3
Gangliosídeo--neuraminidase
Ceramida
β-galactosidase
Ceramida
Glicocerebrosidase — Doença de Gaucher
Ceramida

Globosídeo
Ceramida
Hexosaminidase A e B — Doença de Sandhoff
Ceramida
α-galactosidase A — Doença de Fabry

Esfingomielina
Ceramida Fosfocolina
Esfingomielinase — Doença de Niemann-Pick
Fosfocolina

| Glc | GalNAc |
| --- | --- |
| Gal | Neu5Ac |

**FIGURA Q-1** Rotas de degradação de GM1, globosídeo e esfingomielina a ceramida. Um defeito na enzima que hidrolisa um passo em particular está indicado por ⊗; a doença que resulta do acúmulo de produtos de degradação parcial está indicada.

1 μm

**FIGURA Q-2** Eletromicrografia de uma porção de uma célula do encéfalo de um bebê com a doença de Tay-Sachs, obtida *post mortem*, mostrando depósitos anormais de gangliosídeo no lisossomo.

teróis similares são encontrados em outros eucariotos: estigmasterol em plantas e ergosterol em fungos, por exemplo. As bactérias não conseguem sintetizar esteróis; algumas poucas espécies de bactéria, no entanto, podem incorporar esteróis exógenos em suas membranas. Os esteróis de todos os eucariotos são sintetizados a partir de subunidades de isopreno simples de cinco carbonos, assim como as vitaminas lipossolúveis, as quinonas e os dolicóis descritos na Seção 10.3.

Além de seus papéis como constituintes de membrana, os esteróis servem como precursores para uma diversidade

de produtos com atividades biológicas específicas. Os hormônios esteroides, por exemplo, são sinalizadores biológicos potentes que regulam a expressão gênica. Os **ácidos biliares** são derivados polares do colesterol que atuam como detergentes no intestino, emulsificando as gorduras da dieta para torná-las mais acessíveis às lipases digestivas.

Taurina

OH

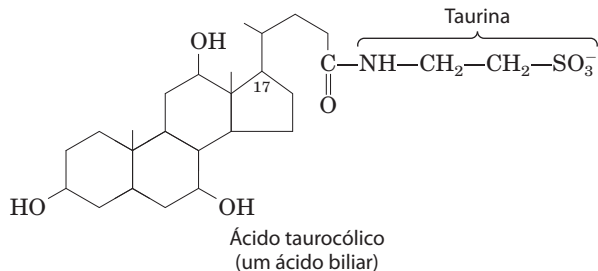
$C—NH—CH_2—CH_2—SO_3^-$

17

O

HO

OH

Ácido taurocólico
(um ácido biliar)

O colesterol e outros esteróis voltarão a ser abordados em capítulos posteriores, para considerar o papel estrutural do colesterol em membranas biológicas (Capítulo 11), a sinalização por hormônios esteroides (Capítulo 12) e a notável rota de biossíntese do colesterol e o transporte do colesterol por carreadores lipoproteicos (Capítulo 21).

### RESUMO 10.2 Lipídeos estruturais em membranas

- Os lipídeos polares, com grupos polares e caudas apolares, são importantes componentes das membranas. Os mais abundantes são os glicerofosfolipídeos, que contêm ácidos graxos esterificados a dois dos grupos hidroxila do glicerol e um segundo álcool, o grupo cabeça, esterificado à terceira hidroxila do glicerol via uma ligação fosfodiéster. Outros lipídeos polares são os esteróis.
- Os glicerofosfolipídeos diferem na estrutura de seu grupo cabeça; os glicerofosfolipídeos comuns são a fosfatidiletanolamina e a fosfatidilcolina. Os grupos polares dos glicerofosfolipídeos estão carregados em pH próximo de 7.
- As membranas dos cloroplastos são ricas em galactolipídeos, compostos de diacilglicerol com um ou dois resíduos de galactose ligados, e sulfolipídeos, diacilgliceróis com um resíduo de açúcar sulfonado ligado e, portanto, um grupo cabeça carregado negativamente.
- Algumas arqueias têm lipídeos de membrana únicos, com grupos alquila de cadeia longa em ligação éter ao glicerol em ambas as extremidades e com resíduos de açúcar e/ou fosfato ligados ao glicerol para fornecer um grupo cabeça polar ou carregado. Esses lipídeos são estáveis nas condições extremas nas quais essas arqueias vivem.
- Os esfingolipídeos contêm esfingosina, um aminoálcool alifático de cadeia longa, mas não contêm glicerol. A esfingomielina tem, além de ácido fosfórico e colina, duas longas cadeias hidrocarbonadas, uma que provém de um ácido graxo e outra que provém de uma esfingosina. Três outras classes de esfingolipídeos são cerebrosídeos, globosídeos e gangliosídeos, que contêm componentes formados por açúcares.
- Os esterois têm quatro anéis fusionados e um grupo hidroxila. O colesterol, o principal esterol em animais, é tanto um componente estrutural das membranas quanto um precursor para uma ampla variedade de esteroides.

## 10.3 Lipídeos como sinalizadores, cofatores e pigmentos

As duas classes funcionais de lipídeos consideradas até agora são importantes componentes celulares; os lipídeos de membrana compõem de 5 a 10% da massa seca da maioria das células, e os lipídeos de armazenamento, mais de 80% da massa de um adipócito. Com algumas exceções importantes, esses lipídeos desempenham um papel *passivo* na célula; os combustíveis lipídicos formam barreiras impermeáveis em volta das células e dos compartimentos celulares. Outro grupo de lipídeos, presente em quantidades bem menores, tem papéis *ativos* no tráfego metabólico como metabólitos e mensageiros. Alguns servem como sinalizadores potentes – como hormônios, carregados no sangue de um tecido a outro, ou como mensageiros intracelulares gerados em resposta a uma sinalização extracelular (hormônio ou fator de crescimento). Outros funcionam como cofatores enzimáticos em reações de transferência de elétrons nos cloroplastos e nas mitocôndrias, ou na transferência de porções de açúcar em várias reações de glicosilação. Um terceiro grupo consiste em lipídeos com um sistema de ligações duplas conjugadas: moléculas de pigmento que absorvem a luz visível. Alguns deles atuam como pigmentos fotossensíveis na visão e na fotossíntese; outros produzem colorações naturais, como o alaranjado das abóboras e cenouras e o amarelo das penas dos canários. Finalmente, um grupo muito grande de lipídeos voláteis produzidos nas plantas serve de sinalizador que é transportado pelo ar, permitindo às plantas comunicarem-se umas com as outras, atraírem animais amigos e dissuadirem inimigos. Esta seção descreve alguns representantes desses lipídeos biologicamente ativos. Em capítulos posteriores, sua síntese e seus papéis ecológicos serão considerados em maior detalhe.

### Fosfatidilinositóis e derivados de esfingosina atuam como sinalizadores intercelulares

O fosfatidilinositol e seus derivados fosforilados atuam em vários níveis para regular a estrutura celular e o metabolismo. O fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (Figura 10-16) na face citoplasmática (interna) da membrana plasmática serve como um reservatório de moléculas mensageiras que são liberadas dentro da célula em resposta a sinais extracelulares interagindo com receptores de superfície específicos. Os sinais extracelulares, como o hormônio vasopressina, ativam uma fosfolipase C específica na membrana, a qual hidrolisa o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato, liberando dois produtos que atuam como mensageiros intracelulares: o inositol-1,4,5-trifosfato ($IP_3$), que é solúvel em água, e o diacilglicerol, que permanece associado à membrana plasmática. O $IP_3$ provoca a liberação de $Ca^{2+}$ do retículo endoplasmático, e a combinação do diacilglicerol e da elevada concentração de $Ca^{2+}$ citosólica ativa a enzima proteína-cinase C. Pela fosforilação de proteínas específicas, essa enzima ativa a resposta celular ao sinal extracelular. Esse mecanismo de sinalização é descrito mais detalhadamente no Capítulo 12 (ver Figura 12-10).

Fosfolipídeos de inositol também servem como pontos de nucleação para complexos supramoleculares envolvidos

na sinalização ou na exocitose. Certas proteínas sinalizadoras ligam-se especificamente ao fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato na membrana plasmática, iniciando a formação de complexos multienzimáticos na superfície citosólica da membrana. A formação de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato em resposta a sinais extracelulares, portanto, agrupa as proteínas em complexos de sinalização na superfície da membrana plasmática (ver Figura 12-16).

Os esfingolipídeos de membrana também podem servir como fontes de mensageiros intracelulares. Tanto a ceramida quanto a esfingomielina (Figura 10-13) são potentes reguladores das proteínas-cinases, e a ceramida ou seus derivados estão envolvidos na regulação da divisão celular, diferenciação, migração e morte celular programada (também chamada de apoptose; ver Capítulo 12).

## Os eicosanoides carregam mensagens a células próximas

Os eicosanoides são hormônios parácrinos, substâncias que atuam somente em células próximas ao ponto de síntese dos hormônios, em vez de serem transportadas no sangue para atuar em células de outros tecidos ou órgãos. Esses derivados de ácidos graxos têm vários efeitos significativos nos tecidos dos vertebrados. Estão envolvidos na função reprodutiva, na inflamação, na febre e na dor associadas aos ferimentos ou à doenças, na formação de coágulos sanguíneos e na regulação da pressão sanguínea, na secreção de ácido gástrico e em vários outros processos importantes na saúde ou na doença de humanos.

Todos os eicosanoides são derivados do ácido araquidônico (20:4[$\Delta^{5,8,11,14}$]) (**Figura 10-18**), o ácido graxo poli-insaturado de 20 carbonos a partir do qual eles levam seu nome geral (do grego *eikosi*, "vinte"). Há três classes de eicosanoides: prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos.

As **prostaglandinas** (PG) contêm um anel de cinco carbonos que se origina da cadeia do ácido araquidônico. Seu nome deriva da glândula próstata, o tecido a partir do qual elas foram isoladas pela primeira vez por Bengt Samuelsson e Sune Bergström. Dois grupos de prostaglandinas foram definidos originalmente: PGE (solúvel em *é*ter) e PGF (solúvel em tampão *f*osfato). Cada grupo contém numerosos subtipos, denominados $PGE_1$, $PGE_2$, $PGF_1$, e assim por diante. As prostaglandinas apresentam diversas funções. Algumas estimulam a contração da musculatura lisa do útero durante a menstruação e o trabalho de parto. Outras afetam o fluxo sanguíneo a órgãos específicos, o ciclo sono-vigília e a sensibilidade de certos tecidos a hormônios como a epinefrina e o glucagon. As prostaglandinas de um terceiro grupo elevam a temperatura corporal (produzindo a febre) e causam inflamação e dor.

Os **tromboxanos** têm um anel de seis membros que contém éter. São produzidos pelas plaquetas (também chamadas de trombócitos) e atuam na formação dos coágulos e na redução do fluxo sanguíneo no local do coágulo. Como mostrado por John Vane, os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) – ácido acetilsalicílico, ibuprofeno e meclofenamato, por exemplo – inibem a enzima prostaglandina $H_2$-sintase (também chamada de ciclo-oxigenase, ou COX), que catalisa um dos passos iniciais na rota do araquidonato às prostaglandinas e aos tromboxanos (Figura 10-18; ver também Figura 21-15).

Os **leucotrienos**, encontrados pela primeira vez em leucócitos, contêm três ligações duplas conjugadas e são poderosos sinalizadores biológicos. Por exemplo, o leuco-

Araquidonato

Prostaglandina $E_1$ ($PGE_1$)

AINEs

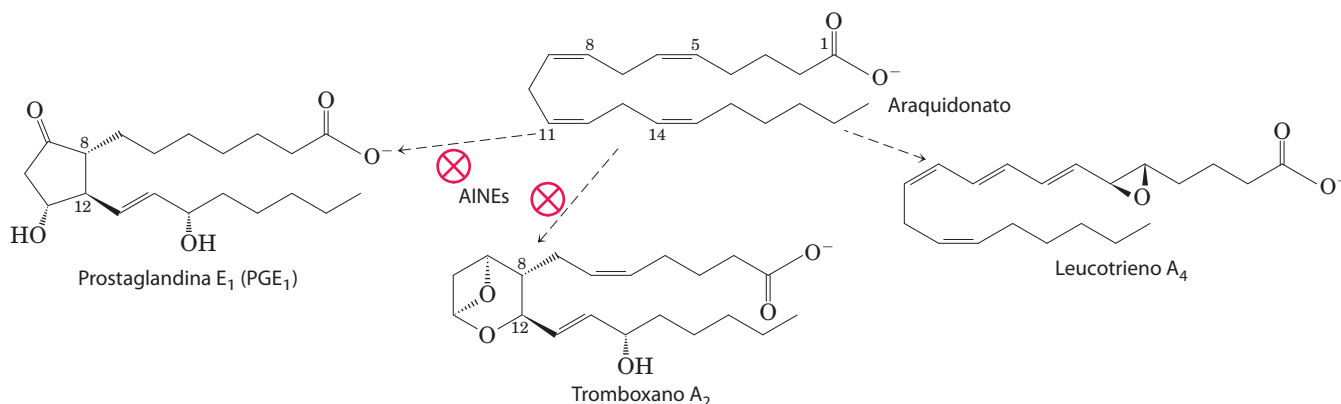
Tromboxano $A_2$

Leucotrieno $A_4$

**FIGURA 10-18 O ácido araquidônico e alguns derivados de eicosanoides.** O ácido araquidônico (araquidonato em pH 7) é o precursor dos eicosanoides, incluindo as prostaglandinas, os tromboxanos e os leucotrienos. Na prostaglandina $E_1$, o C-8 e o C-12 do araquidonato se juntam para formar o característico anel com cinco membros. No tromboxano $A_2$, o C-8 e o C-12 se juntam e um átomo de oxigênio é adicionado para formar o anel de seis membros. O leucotrieno $A_4$ tem uma série de três ligações duplas conjugadas. Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), como a aspirina e o ibuprofeno, bloqueiam a formação de prostaglandinas e tromboxanos a partir do araquidonato pela inibição da enzima ciclo-oxigenase (prostaglandina $H_2$-sintase).

John Vane (1927-2004), Sune Bergström (1916-2004) e Bengt Samuelsson

trieno $D_4$, derivado do leucotrieno $A_4$, induz a contração da musculatura lisa que envolve as vias aéreas até o pulmão. A produção excessiva de leucotrienos causa a crise de asma, e a síntese de leucotrienos é um dos alvos dos fármacos antiasmáticos, como a prednisona. A forte contração da musculatura lisa dos pulmões que ocorre durante o choque anafilático é parte da reação alérgica potencialmente fatal em indivíduos hipersensíveis a ferroadas de abelha, penicilina ou outros agentes. ■

## Os hormônios esteroides carregam mensagens entre os tecidos

Os esteroides são derivados oxidados dos esteróis; eles têm o núcleo esterol, mas não a cadeia alquila ligada ao anel D do colesterol. Os hormônios esteroides circulam pela corrente sanguínea (em carreadores proteicos) do local onde foram produzidos até os tecidos-alvo, onde entram nas células, ligam-se a receptores proteicos altamente específicos no núcleo e causam mudanças na expressão gênica e, portanto, no metabolismo. Como os hormônios têm afinidade muito alta por seus receptores, concentrações muito baixas (nanomolar ou menos) são suficientes para produzir respostas nos tecidos-alvo. Os principais grupos de hormônios esteroides são os hormônios sexuais masculinos e femininos e os hormônios produzidos pelo córtex suprarrenal, cortisol e aldosterona (**Figura 10-19**). A prednisona e a prednisolona são fármacos esteroides com atividades anti-inflamatórias potentes, mediadas em parte pela inibição da liberação do araquidonato pela fosfolipase $A_2$ e pela consequente inibição da síntese de leucotrienos, prostaglandinas e tromboxanos. Elas têm uma série de aplicações médicas, incluindo o tratamento de asma e de artrite reumatoide. ■

As plantas vasculares contêm o brassinolídeo tipo esteroide (Figura 10-19), potente regulador do crescimento, que aumenta a taxa de alongamento do caule e afeta a orientação das microfibrilas de celulose na parede celular durante o crescimento.

## As plantas vasculares produzem milhares de sinais voláteis

As plantas produzem literalmente milhares de diferentes compostos lipofílicos, substâncias voláteis utilizadas para atrair os polinizadores, para repelir herbívoros, para atrair organismos que defendem a planta contra herbívoros e para a comunicação com outras plantas. O jasmonato, por exemplo (ver Figura 12-33), derivado do ácido graxo 18:3($\Delta^{9,12,15}$) em lipídeos de membrana, ativa as defesas da planta em resposta ao dano infligido por insetos. O metil éster de jasmonato dá a fragrância característica do óleo de jasmim, amplamente utilizado na indústria de perfume. Muitos dos voláteis das plantas são derivados de ácidos graxos ou de compostos feitos pela condensação de unidades isopreno de cinco carbonos; eles incluem geraniol (o cheiro característico dos ge-

Testosterona

Cortisol

Prednisona

β-Estradiol

Aldosterona

Prednisolona

Brassinolídeo (brassinosteroide)

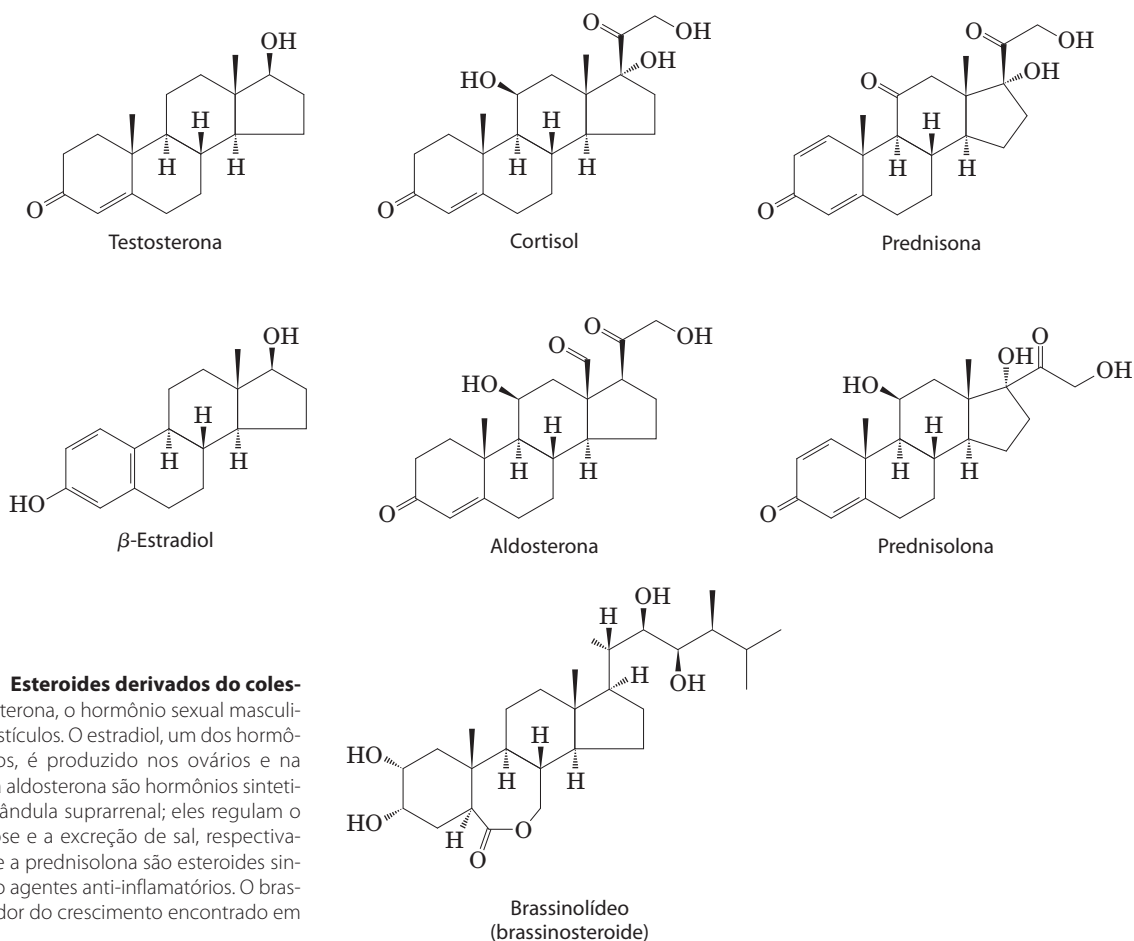
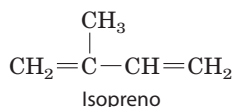



**FIGURA 10-19 Esteroides derivados do colesterol.** A testosterona, o hormônio sexual masculino, é produzida nos testículos. O estradiol, um dos hormônios sexuais femininos, é produzido nos ovários e na placenta. O cortisol e a aldosterona são hormônios sintetizados no córtex da glândula suprarrenal; eles regulam o metabolismo da glicose e a excreção de sal, respectivamente. A prednisona e a prednisolona são esteroides sintéticos utilizados como agentes anti-inflamatórios. O brassinolídeo é um regulador do crescimento encontrado em plantas vasculares.

rânios), β-pineno (pinheiros), limoneno (limões), mentol e carvona (ver Figura 1-24a), para citar alguns.

$$CH_2{=}C(CH_3){-}CH{=}CH_2$$

Isopreno

## As vitaminas A e D são precursoras de hormônios

Durante o primeiro terço do século XX, um grande foco de pesquisa em química fisiológica foi a identificação das **vitaminas**, compostos essenciais para a saúde do homem e de outros vertebrados, mas que não podem ser sintetizados por esses animais e devem, portanto, ser obtidos da dieta. Os primeiros estudos nutricionais identificaram duas classes gerais desse tipo de composto: os que eram solúveis em solventes orgânicos apolares (vitaminas lipossolúveis) e os que podiam ser extraídos dos alimentos com solventes aquosos (vitaminas hidrossolúveis). Posteriormente, o grupo lipossolúvel foi dividido nos quatro grupos das vitaminas A, D, E e K, todos compostos isoprenoides sintetizados pela condensação de múltiplas unidades de isopreno. Dois deles (D e A) servem como precursores de hormônios.

A **vitamina $D_3$**, também chamada de **colecalciferol**, normalmente é formada na pele a partir de 7-desidrocolesterol em uma reação fotoquímica catalisada pelo componente UV da luz solar (**Figura 10-20a**). A vitamina $D_3$ não é biologicamente ativa, mas é convertida por enzimas no fígado e no rim a 1α,25-di-hidroxivitamina $D_3$ (calcitriol), hormônio que regula a captação de cálcio no intestino e os níveis de cálcio no rim e nos ossos. A deficiência de vitamina D leva à formação defeituosa dos ossos e a uma doença chamada raquitismo, para a qual a administração de vitamina D produz uma cura dramática (Figura 10-20b). A vitamina $D_2$ (ergocalcificerol) é um produto comercial formado pela radiação com UV do ergosterol de levedura. A vitamina $D_2$ é estruturalmente similar à $D_3$, com leve modificação da cadeia lateral ligada ao anel D do esterol. Ambas têm os mesmos efeitos biológicos, e a $D_2$ é comumente adicionada ao leite e à manteiga como suplemento alimentar. Como os hormônios esteroides, o produto do metabolismo da vitamina D, 1α,25-di-hidroxivitamina $D_3$, regula a expressão gênica interagindo com receptores proteicos nucleares específicos (p. 1182-1183).

A **vitamina A** (**retinol**), em suas várias formas, funciona como um hormônio e como pigmento fotossensível do olho dos vertebrados (**Figura 10-21**). Atuando por meio de proteínas receptoras no núcleo da célula, o derivado da vitamina A, ácido retinoico, regula a expressão gênica no desenvolvimento do tecido epitelial, incluindo a pele. O ácido retinoico é o composto ativo no fármaco tretinoína (Retin-A), utilizado no tratamento de acne grave e rugas na pele. O retinal, outro derivado da vitamina A, é o pigmento que inicia a resposta dos bastonetes e dos cones da retina à luz, produzindo um sinal neuronal para o cérebro. Esse papel do retinal é descrito em detalhes no Capítulo 12.

(a)

7-Desidrocolesterol —Luz UV, 2 passos (na pele)→ Colecalciferol (vitamina $D_3$) —1 passo no fígado, 1 passo no rim→ 1α,25-Di-hidroxivitamina $D_3$ (calcitriol)

(b)

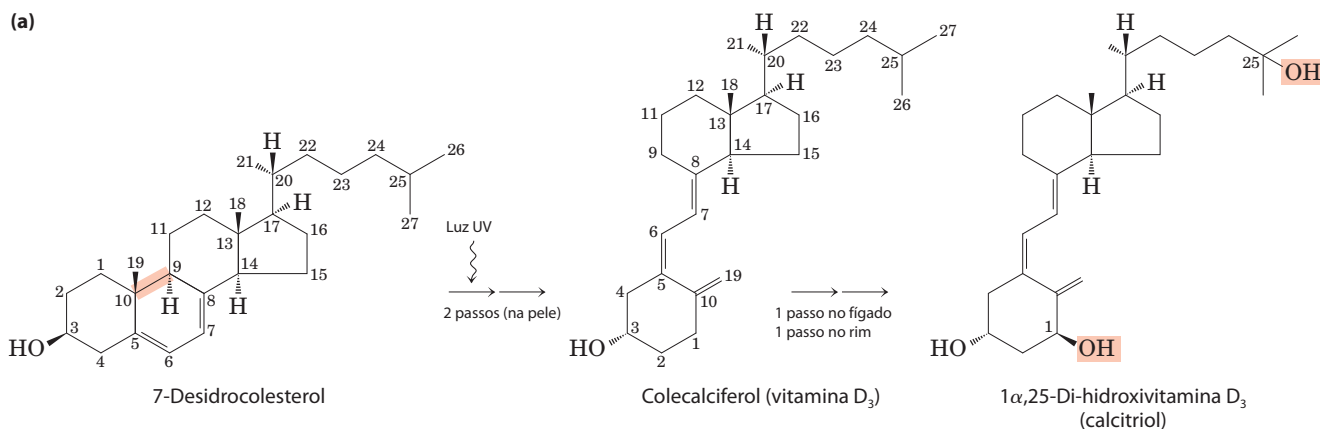



**FIGURA 10-20 A produção da vitamina $D_3$ e o metabolismo.** **(a)** O colecalciferol (vitamina $D_3$) é produzido na pele pela radiação UV sobre o 7-desidrocolesterol, que rompe a ligação que está em cor salmão. No fígado, um grupo hidroxila é adicionado ao C-25; no rim, uma segunda hidroxilação em C-1 produz o hormônio ativo, 1α,25-di-hidroxivitamina $D_3$. Este hormônio regula o metabolismo do $Ca^{2+}$ no rim, no intestino e nos ossos. **(b)** A vitamina D da dieta evita o raquitismo, uma doença comum em climas frios, em que as roupas pesadas bloqueiam o componente UV da luz solar necessário para a produção da vitamina $D_3$ na pele. Neste detalhe de um grande mural de John Steuart Curry, *Os benefícios sociais da pesquisa bioquímica* (1943), as pessoas e os animais à esquerda representam os efeitos da nutrição pobre, incluindo as pernas arqueadas de um menino com raquitismo clássico. À direita estão as pessoas e os animais mais saudáveis com os "benefícios sociais da pesquisa", incluindo o uso da vitamina D para prevenir e tratar o raquitismo. Este mural está no Departamento de Bioquímica na Universidade de Wisconsin-Madison.

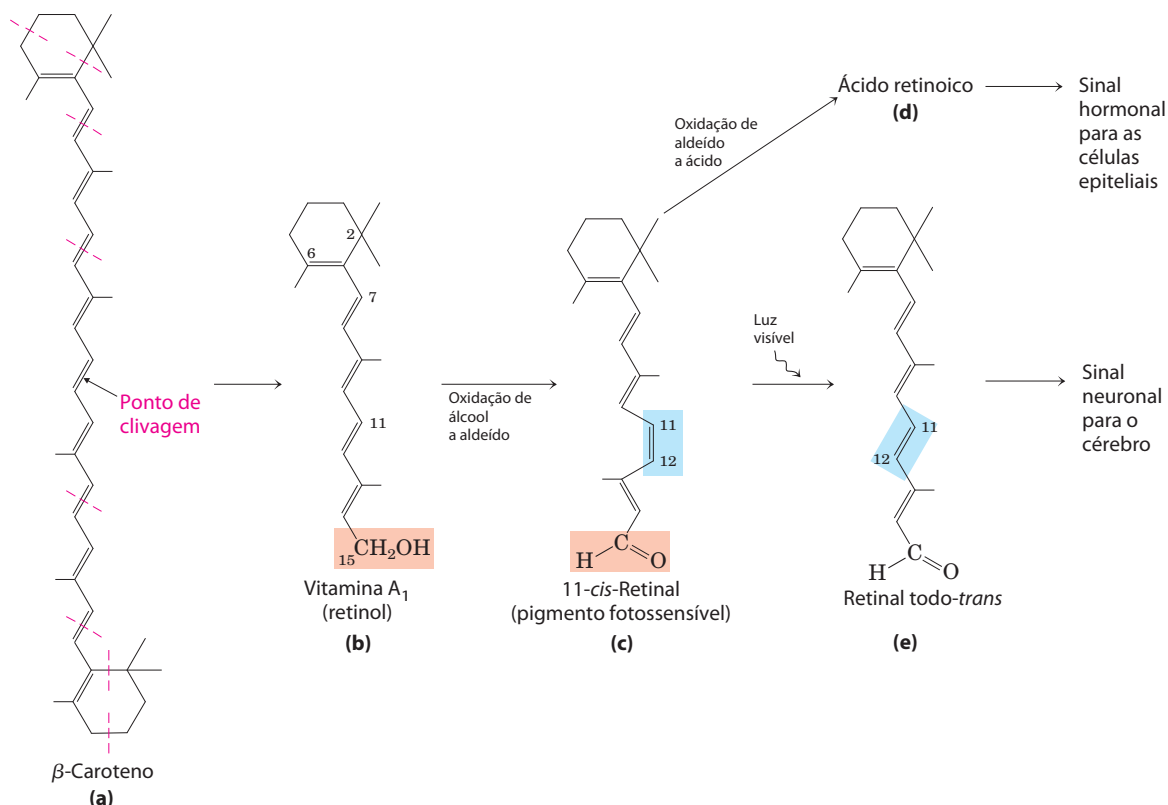



**FIGURA 10-21 Vitamina $A_1$, seu precursor e derivados.** **(a)** β-Caroteno é o precursor da vitamina $A_1$. Unidades estruturais de isopreno estão indicadas por linhas tracejadas vermelhas (ver p. 373). A clivagem do β-caroteno gera duas moléculas de vitamina $A_1$ (retinol). **(b)** A oxidação no C-15 converte o retinol a aldeído, retinal **(c)**, e uma oxidação posterior produz ácido retinoico **(d)**, hormônio que regula a expressão gênica. O retinal se combina com a proteína opsina para formar rodopsina (não mostrada), pigmento fotossensível amplamente disseminado na natureza. No escuro, o retinal da rodopsina está na forma 11-*cis* (c). Quando a molécula de rodopsina é excitada pela luz visível, o 11-*cis*-retinal passa por uma série de reações fotoquímicas que o convertem em retinal todo-*trans* **(e)**, forçando uma mudança na forma da molécula de rodopsina inteira. Essa transformação no bastonete da retina dos vertebrados emite um sinal elétrico para o cérebro que é a base da transdução visual, tópico a ser tratado com mais detalhe no Capítulo 12.

A vitamina A foi primeiro isolada de óleos de fígado de peixe; fígado, ovos, leite integral e manteiga também são boas fontes. Em vertebrados, o β-caroteno, o pigmento que dá às cenouras, à batata-doce e a outros vegetais amarelos a sua cor característica, pode ser convertido enzimaticamente a vitamina A. A deficiência dessa vitamina ocasiona vários sintomas em humanos, incluindo secura da pele, dos olhos e das membranas mucosas; desenvolvimento e crescimento retardados; e cegueira noturna, frequente sintoma inicial no diagnóstico de deficiência de vitamina A. ■

## As vitaminas E e K e as quinonas lipídicas são cofatores de oxirredução

A **vitamina E** é o nome coletivo para um grupo de lipídeos relacionados chamados **tocoferóis**, que contêm um anel aromático substituído e uma cadeia lateral longa de isoprenoide (**Figura 10-22a**). Por serem hidrofóbicos, os tocoferóis se associam com as membranas celulares, com os depósitos de lipídeos e com as lipoproteínas no sangue. Os tocoferóis são antioxidantes biológicos. O anel aromático reage com as formas mais reativas de radicais de oxigênio e outros radicais livres e as destrói, protegendo os ácidos graxos insaturados da oxidação e impedindo o dano oxidativo aos lipídeos de membrana, o que pode causar fragilidade celular. Os tocoferóis são encontrados nos ovos e nos óleos vegetais e são especialmente abundantes no germe de trigo. Animais de laboratório alimentados com dietas deficientes em vitamina E desenvolvem pele escamosa, fraqueza muscular e esterilidade. A deficiência de vitamina E em humanos é muito rara; o principal sintoma é a fragilidade dos eritrócitos.

O anel aromático da **vitamina K** (Figura 10-22b) passa por um ciclo de oxidação e redução durante a formação da protrombina ativa, proteína do plasma sanguíneo essencial na coagulação. A protrombina é uma enzima proteolítica que quebra ligações peptídicas na proteína sanguínea fibrinogênio para convertê-la em fibrina, a proteína fibrosa insolúvel que une os coágulos sanguíneos (ver Figura 6-39). Henrik Dam e Edward A. Doisy descobriram que a deficiência de vitamina K retarda a coagulação sanguínea, o que pode ser fatal. A deficiência dessa vitamina é muito incomum em humanos, com exceção de uma pequena porcentagem de bebês que sofrem da doença hemorrágica do recém-nascido, condição potencialmente fatal. Nos Estados Unidos, os recém-nascidos recebem rotineiramente uma injeção de 1 mg de vitamina K. A vitamina $K_1$ (filoquinona) é encontrada nas folhas de plantas verdes; uma forma relacionada, a vitamina $K_2$ (menaquinona), é produzida por bactérias que vivem no intestino de vertebrados.

**(a)**
Vitamina E: antioxidante

**(b)**
Vitamina $K_1$: cofator da coagulação sanguínea (filoquinona)

**(c)**
Varfarina: anticoagulante sanguíneo

**(d)**
Ubiquinona: transportador de elétrons da mitocôndria (coenzima Q) ($n$ = 4 a 8)

**(e)**
Plastoquinona: transportador de elétrons do cloroplasto ($n$ = 4 a 8)

**(f)**
Dolicol: transportador de açúcar ($n$ = 9 a 22)

**FIGURA 10-22 Alguns outros compostos isoprenoides biologicamente ativos ou derivados.** As unidades derivadas do isopreno estão indicadas com linhas vermelhas tracejadas. Na maioria dos tecidos de mamíferos, a ubiquinona (também chamada de coenzima Q) tem 10 unidades de isopreno. Os dolicóis dos animais têm de 17 a 21 unidades de isopreno (85 a 105 átomos de carbono), os dolicóis bacterianos têm 11, e os de plantas e fungos têm de 14 a 24.

Henrik Dam, 1895–1976

Edward A. Doisy, 1893–1986

A warfarina (Figura 10-22c), composto sintético que inibe a formação de protrombina ativa, é particularmente venenosa para ratos, causando a morte por sangramento interno. Ironicamente, esse potente raticida também é um fármaco anticoagulante inestimável para tratar humanos em risco por coagulação sanguínea excessiva, como os pacientes cirúrgicos e aqueles com trombose coronária. ■

A ubiquinona (também chamada de coenzima Q) e a plastoquinona (Figura 10-22d, e) são isoprenoides que funcionam como transportadores lipofílicos de elétrons em reações de oxirredução que levam à síntese de ATP na mitocôndria e nos cloroplastos, respectivamente. Ambas podem aceitar um ou dois elétrons e um ou dois prótons (ver Figura 19-3).

## Os dolicóis ativam precursores de açúcares para a biossíntese

Durante a montagem dos carboidratos complexos das paredes celulares bacterianas e durante a adição de unidades de polissacarídeo a certas proteínas (glicoproteínas) e lipídeos (glicolipídeos) em eucariotos, as unidades de açúcar a serem adicionadas são quimicamente ativadas pela ligação a alcoóis isoprenoides chamados de **dolicóis** (Figura 10-22f). Esses compostos têm fortes interações hidrofóbicas com lipídeos de membrana, ancorando na membrana os açúcares ligados, onde participam de reações de transferência de açúcares.

Cantaxantina
(vermelho vivo)

Zeaxantina
(amarelo vivo)

**FIGURA 10-23 Lipídeos como pigmentos nas plantas e nas penas das aves.** Compostos com sistemas conjugados longos absorvem luz na região visível do espectro. As diferenças sutis na química desses compostos produzem pigmentos de cores notavelmente diferentes. As aves adquirem os pigmentos que dão as cores vermelha ou amarela às suas penas comendo materiais de plantas que contêm pigmentos carotenoides, como a cantaxantina e a zeaxantina. As diferenças na pigmentação entre machos e fêmeas de aves são resultado de diferenças na absorção e no processamento intestinal dos carotenoides.

## Muitos pigmentos naturais são dienos conjugados a lipídeos

Os dienos conjugados possuem cadeias de carbono com ligações simples e duplas alternadas. Como esse arranjo estrutural permite o movimento dos elétrons, os compostos podem ser excitados por radiações eletromagnéticas de baixa energia (luz visível), dando a eles cores visíveis para humanos e outros animais. O caroteno (Figura 10-21) é amarelo-alaranjado; compostos similares dão às penas das aves seus vistosos vermelhos, alaranjados e amarelos (**Figura 10-23**). Como os esteróis, esteroides, dolicóis, vitaminas A, E, D e K, ubiquinona e plastoquinona, esses pigmentos são sintetizados a partir de derivados de isopreno de cinco carbonos; a rota biossintética é descrita em detalhes no Capítulo 21.

## Os policetídeos são produtos naturais com atividades biológicas

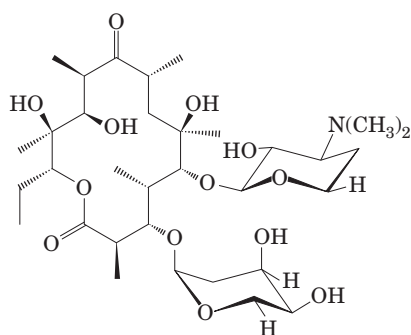
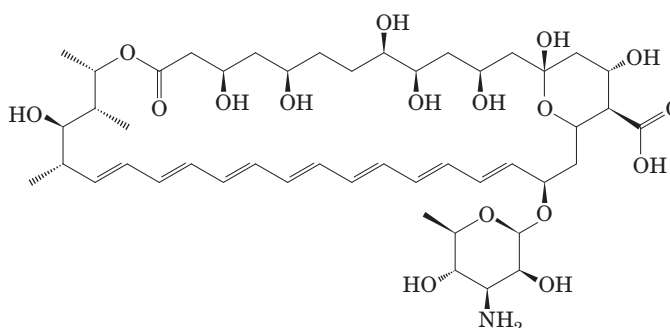
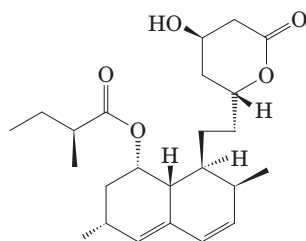
Os **policetídeos** são um grupo de lipídeos diversos com vias biossintéticas semelhantes (condensação de Claisen) àquelas dos ácidos graxos. São **metabólitos secundários**, compostos não essenciais para o metabolismo de um organismo, mas com algumas funções subsidiárias que dão aos seus produtores uma vantagem em algum nicho ecológico. Muitos policetídeos têm utilidade na medicina como antibióticos (eritromicina), antifúngicos (anfotericina B) ou inibidores da síntese do colesterol (lovastatina) (**Figura 10-24**).

Eritromicina (antibiótico)

Anfotericina B (antifúngico)

Lovastatina (estatina)

**FIGURA 10-24 Três produtos naturais policetídeos usados na medicina humana.**

## RESUMO 10.3 Lipídeos como sinalizadores, cofatores e pigmentos

- Alguns tipos de lipídeos, embora presentes em quantidades relativamente baixas, desempenham papéis cruciais como cofatores ou sinalizadores.
- O fosfatidilinositol-bifosfato é hidrolisado para produzir dois mensageiros intracelulares, o diacilglicerol e o inositol-1,4,5-trifosfato. O fosfatidilinositol-3,4,5--trifosfato é um ponto de nucleação para complexos proteicos supramoleculares envolvidos na sinalização biológica.
- As prostaglandinas, os tromboxanos e os leucotrienos (os eicosanoides), derivados do araquidonato, são hormônios extremamente potentes.
- Os hormônios esteroides, tal como os hormônios sexuais, são derivados dos esteróis. Servem como poderosos sinalizadores biológicos, alterando a expressão gênica nas células alvos.
- As vitaminas D, A, E e K são compostos lipossolúveis constituídos por unidades de isopreno. Todos desempenham papéis essenciais no metabolismo ou na fisiologia dos animais. A vitamina D é precursora de um hormônio que regula o metabolismo do cálcio. A vitamina A fornece o pigmento fotossensível do olho dos vertebrados e é um regulador da expressão gênica durante o crescimento das células epiteliais. A vitamina E funciona na proteção dos lipídeos de membrana contra o dano oxidativo, e a vitamina K é essencial no processo de coagulação sanguínea.
- As ubiquinonas e as plastoquinonas, também derivadas de isoprenoides, são transportadores de elétrons nas mitocôndrias e nos cloroplastos, respectivamente.
- Os dolicóis ativam e ancoram os açúcares às membranas celulares; os grupos açúcar são então utilizados na síntese de carboidratos complexos, glicolipídeos e glicoproteínas.
- Os dienos conjugados a lipídeos servem como pigmentos nas flores e nos frutos e dão às penas das aves suas cores vistosas.
- Os policetídeos são produtos naturais amplamente usados na medicina.

# 10.4 Trabalhando com lipídeos

Como os lipídeos são insolúveis em água, sua extração e seu posterior fracionamento requerem o uso de solventes orgânicos e de algumas técnicas pouco utilizadas na purificação de moléculas hidrossolúveis, como as proteínas e os carboidratos. Em geral, misturas complexas de lipídeos são separadas por diferenças na polaridade ou na solubilidade em solventes apolares. Os lipídeos que contêm ácidos graxos ligados a éster ou amida podem ser hidrolisados pelo tratamento com ácido ou base ou com enzimas hidrolíticas específicas (fosfolipases, glicosidases) para liberar seus componentes para análise. Alguns métodos comumente utilizados nas análises de lipídeos são mostrados na **Figura 10-25** e discutidos a seguir.

## A extração de lipídeos requer solventes orgânicos

Os lipídeos neutros (triacilgliceróis, ceras, pigmentos, etc.) são prontamente extraídos dos tecidos com éter etílico, clorofórmio ou benzeno, solventes que não permitem a agregação causada pelas interações hidrofóbicas. Os lipí-

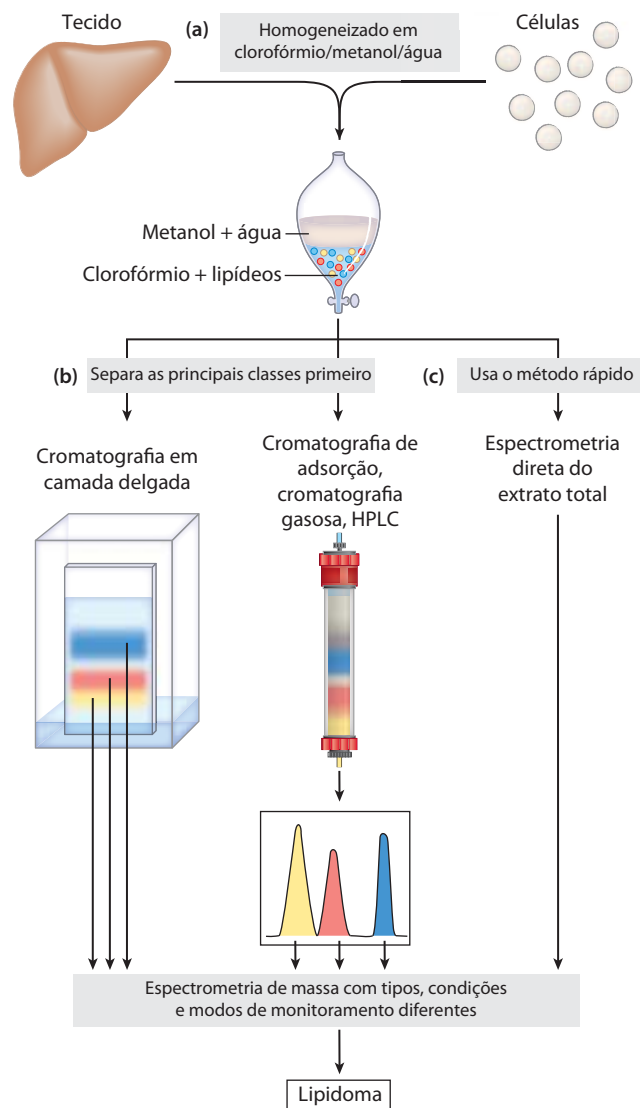



**FIGURA 10-25 Procedimentos comuns na extração, na separação e na identificação de lipídeos celulares. (a)** O tecido é homogeneizado em uma mistura de clorofórmio/metanol/água, que gera duas fases com a adição de água e a remoção dos sedimentos não extraíveis por centrifugação. **(b)** As principais classes dos lipídeos extraídos na fase clorofórmio podem ser primeiro separados por cromatografia de camada delgada (CCD), na qual os lipídeos são carregados para cima em uma placa de sílica coberta de gel por uma frente ascendente de solvente, com os lipídeos menos polares migrando mais do que os lipídeos mais polares ou carregados, ou por cromatografia de adsorção em uma coluna de sílica gel em que passam solventes de polaridade crescente. Por exemplo, cromatografia em coluna com solventes apropriados pode ser usada para separar espécies lipídicas intimamente relacionadas, tal como fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, e fosfatidilinositol. Uma vez separados, os ácidos graxos complementares a cada lipídeo podem ser determinados por espectrometria de massa. **(c)** Alternativamente, no método rápido, um extrato de lipídeos não fracionado pode ser diretamente submetido à espectrometria de massa de alta resolução de diferentes tipos e sob condições distintas para determinar a composição total de todos os lipídeos: o lipidoma.

deos de membrana são mais bem extraídos por solventes orgânicos mais polares, como o etanol ou o metanol, que reduzem as interações hidrofóbicas entre as moléculas lipídicas enquanto também enfraquecem as ligações de hidrogênio e as interações eletrostáticas que ligam os lipídeos de membrana às proteínas de membrana. Um extrator bastante utilizado é uma mistura de clorofórmio, metanol e água, inicialmente em proporções de volume (1:2:0:8) que são miscíveis, produzindo uma única fase. Depois que o tecido é homogeneizado nesse solvente para extrair todos os lipídeos, mais água é adicionada ao extrato resultante, e a mistura separa-se em duas fases, metanol/água (fase de cima) e clorofórmio (fase de baixo). Os lipídeos permanecem na camada com clorofórmio, e as moléculas mais polares, como as proteínas e os açúcares, repartem-se na camada de metanol/água (Figura 10-25a).

## A cromatografia de adsorção separa lipídeos de polaridades diferentes

Misturas complexas de lipídeos dos tecidos podem ser fracionadas por procedimentos cromatográficos com base nas diferentes polaridades de cada classe de lipídeo (Figura 10-25b). Na cromatografia de adsorção, um material insolúvel polar como sílica gel (forma de ácido silícico, $Si[OH]_4$) é colocado em uma coluna de vidro, e a mistura de lipídeos (na solução de clorofórmio) é aplicada no topo da coluna. (Na cromatografia líquida de alto desempenho, a alta pressão força os solventes através da coluna, que tem um diâmetro menor.) Os lipídeos polares se ligam fortemente ao ácido silícico, e os lipídeos neutros passam diretamente através da coluna e emergem na primeira eluição com clorofórmio. Os lipídeos polares são então eluídos em ordem crescente de polaridade, lavando a coluna com solventes de polaridade progressivamente mais alta. Lipídeos polares não carregados (p. ex., cerebrosídeos) são eluídos com acetona, e lipídeos muito polares ou carregados (como os glicerofosfolipídeos) são eluídos com metanol.

A cromatografia em camada delgada em ácido silícico aplica o mesmo princípio (Figura 10-25b). Uma fina camada de sílica gel é espalhada sobre uma placa de vidro, à qual ela se adere. Uma pequena amostra de lipídeos dissolvidos em clorofórmio é aplicada perto de uma das margens da placa, que é imersa em um recipiente raso com um solvente orgânico ou uma mistura de solventes; o conjunto é colocado em uma câmara saturada com vapor do solvente. À medida que o solvente ascende pela placa por capilaridade, ele carrega os lipídeos com ele. Os lipídeos menos polares migram mais, pois têm menor tendência a se ligarem ao ácido silícico. Os lipídeos separados podem ser detectados pela pulverização da placa com um corante (rodamina) que emite fluorescência quando associado aos lipídeos, ou pela exposição da placa a vapores de iodo. O iodo reage reversivelmente com as ligações duplas nos ácidos graxos, de forma que os lipídeos que contêm ácidos graxos insaturados desenvolvem uma coloração amarela ou marrom. Vários outros reagentes de pulverização também são úteis na detecção de lipídeos específicos. Para análise subsequente, as regiões que contêm lipídeos isolados podem ser raspadas da placa e os lipídeos podem ser recuperados por meio de extração com um solvente orgânico.

## A cromatografia gasosa-líquida separa misturas de derivados voláteis de lipídeos

A cromatografia gasosa-líquida separa os componentes de uma mistura de acordo com suas tendências relativas a dissolverem-se no material inerte contido na coluna cromatográfica ou a volatilizarem-se e migrarem através da coluna, carregados por uma corrente de um gás inerte como o hélio. Alguns lipídeos são naturalmente voláteis, mas a maioria necessita ser primeiro derivatizada para aumentar sua volatilidade (i.e, diminuir seu ponto de ebulição). Para uma análise dos ácidos graxos em uma amostra de fosfolipídeos, os lipídeos são primeiro transesterificados: aquecidos em uma mistura de metanol/HCl ou metanol/NaOH para converter os ácidos graxos esterificados com o glicerol nos seus respectivos metil ésteres. Esses metil ésteres de acilas graxas são então aplicados em coluna cromatográfica de gás-líquido e a coluna é aquecida para volatilizar os compostos. Os ésteres de acilas graxas mais solúveis no material da coluna repartem-se (dissolvem-se) naquele material; os lipídeos menos solúveis são carregados pela corrente de gás inerte e emergem primeiro da coluna. A ordem de eluição depende da natureza do adsorvente sólido na coluna e do ponto de ebulição dos componentes da mistura lipídica. Utilizando-se essas técnicas, as misturas de ácidos graxos de vários comprimentos de cadeia e vários graus de insaturação podem ser completamente separadas.

## A hidrólise específica auxilia na determinação das estruturas dos lipídeos

Algumas classes de lipídeos são suscetíveis à degradação sob condições específicas. Por exemplo, todos os ácidos graxos com ligação éster nos triacilgliceróis, os fosfolipídeos e os ésteres de esterol são liberados em tratamento fracamente ácido ou alcalino, e em condições mais extremas de hidrólise há liberação dos ácidos graxos ligados com ligação amida, como ocorre nos esfingolipídeos. As enzimas que especificamente hidrolisam certos lipídeos também são úteis na determinação da estrutura dos lipídeos. As fosfolipases A, C e D (Figura 10-16) clivam ligações particulares nos fosfolipídeos e geram produtos com solubilidades e comportamentos cromatográficos característicos. A fosfolipase C, por exemplo, libera um álcool fosforilado solúvel em água (como a fosfocolina da fosfatidilcolina) e um diacilglicerol solúvel em clorofórmio, cada qual podendo ser caracterizado separadamente para determinar a estrutura do fosfolipídeo intacto. A combinação da hidrólise específica com a caracterização dos produtos pelas cromatografias em camada delgada, gasosa-líquida e de alto desempenho frequentemente permite a determinação de uma estrutura lipídica.

## A espectrometria de massa revela a estrutura lipídica completa

Para se estabelecer, sem ambiguidade, o comprimento de uma cadeia hidrocarbonada ou a posição das ligações duplas, a análise espectrométrica de massa dos lipídeos ou de seus derivados voláteis é fundamental. As propriedades químicas de lipídeos similares (p. ex., dois ácidos graxos de comprimentos similares insaturados em posições diferentes, ou dois isoprenoides com números diferentes de unida-

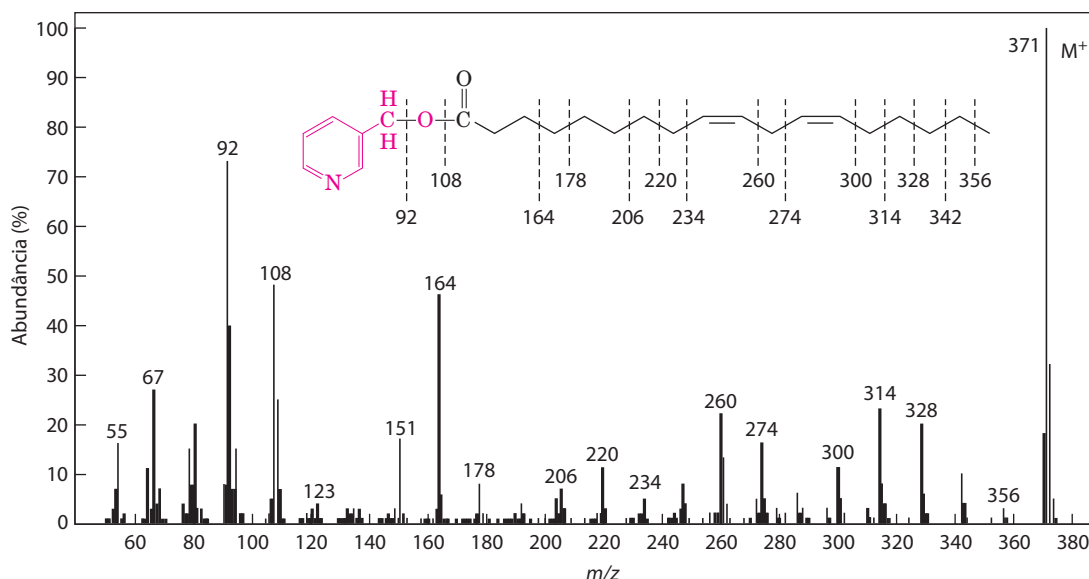



**FIGURA 10-26 Determinação da estrutura de ácidos graxos por espectrometria de massa.** O ácido graxo é convertido primeiro em um derivado que minimiza a migração das ligações duplas quando a molécula é fragmentada pelo bombardeamento de elétrons. O derivado aqui apresentado é um éster de picolinil do ácido linoleico – 18:2($\Delta^{9,12}$) ($M_R$ 371) –, no qual o álcool é o picolinol (em vermelho). Quando bombardeada com uma corrente de elétrons, essa molécula é volatilizada e convertida a um íon precursor ($M^+$; $M_r$ 371), no qual o átomo N possui a carga positiva e uma série de fragmentos menores produzidos pela quebra de ligações C—C em ácidos graxos. O espectrômetro de massa separa esses fragmentos carregados de acordo com a sua razão massa/carga (*m/z*). (Para revisar os princípios da espectrometria de massa, ver p. 100-102.)

Os íons proeminentes em *m/z* = 92, 108, 151 e 164 contêm o anel de piridina do picolinol e vários fragmentos do grupo carboxil, mostrando que o composto é de fato um éster de picolinil. O íon molecular, $M^+$ (*m/z* = 371), confirma a presença de um ácido graxo de $C_{18}$ com duas ligações duplas. A série uniforme de íons de 14 unidades de massa molecular (u) de distância representa a perda sucessiva de cada grupo metil e metileno da extremidade metilada da cadeia de acila (começando no C-18; a extremidade direita da molécula é mostrada aqui), até que o íon atinja *m/z* = 300. Isso é seguido por uma lacuna de 26 u para os carbonos da ligação dupla terminal, em *m/z* = 274; uma lacuna de 14 u mais adiante para o grupo metileno do C-11, em *m/z* = 260; e assim por diante. Dessa maneira, a estrutura inteira é determinada, ainda que esses dados isolados não revelem a configuração (*cis* ou *trans*) das ligações duplas.

des de isopreno) são muito parecidas, e a ordem de eluição dos vários procedimentos cromatográficos frequentemente não muda entre eles. No entanto, quando o eluato de uma coluna cromatográfica é amostrado por espectrometria de massa, os componentes de uma mistura lipídica podem ser separados simultaneamente e identificados por seus padrões únicos de fragmentação (**Figura 10-26**). Com o aumento da resolução da espectroscopia de massa, é possível identificar lipídeos individuais em misturas bastante complexas sem primeiro fracionar os lipídeos do extrato bruto. Esse método (Figura 10-25c) evita perdas durante a separação preliminar das subclasses de lipídeos, e é mais rápido.

## O lipidoma procura catalogar todos os lipídeos e suas funções

Na exploração dos papéis biológicos dos lipídeos nas células e nos tecidos, é importante saber quais estão presentes e em quais proporções, e saber como essa composição lipídica muda com o desenvolvimento embrionário, com a doença ou durante o tratamento com fármacos. Devido aos milhares de lipídeos diferentes que ocorrem naturalmente, os bioquímicos que trabalham com lipídeos propuseram um novo sistema de nomenclatura, com o propósito de tornar mais fácil a compilação e a localização nas bases de dados de composição lipídica. O sistema coloca cada lipídeo em um de oito grupos químicos (Tabela 10-3) designados por duas letras. Dentro desses grupos, distinções mais refinadas são indicadas por classes e subclasses numeradas. Por exemplo, todas as glicerofosfocolinas são GP01; o subgrupo de glicerofosfocolinas com dois ácidos graxos em ligação éster é designado GP0101; com um ácido graxo em ligação éter na posição 1 e um em ligação éster na posição 2, o subgrupo é designado GP0102. Ácidos graxos específicos são designados por números que dão a cada lipídeo seu próprio identificador único, de forma que cada lipídeo individual, bem como tipos ainda não descobertos, pode ser descrito sem ambiguidade em termos de um identificador de 12 caracteres. Um fator utilizado na classificação é a natureza do precursor biossintético. Por exemplo, lipídeos prenóis (p. ex., dolicóis e vitaminas E e K) são formados a partir de precursores isoprenil. Os policetídeos incluem alguns produtos naturais, muitos tóxicos, com rotas biossintéticas relacionadas às dos ácidos graxos. As oito categorias químicas na Tabela 10-3 não coincidem perfeitamente com as divisões de acordo com a função biológica utilizadas neste capítulo. Por exemplo, os lipídeos estruturais das membranas incluem tanto os glicerofosfolipídeos quanto os esfingolipídeos, categorias separadas na Tabela 10-3. Cada método de categorização tem suas vantagens.

A aplicação de técnicas de espectrometria de massa com alta capacidade e alta resolução pode fornecer catálogos quantitativos de todos os lipídeos presentes em um tipo de célula específico, sob condições particulares – o **lipidoma** – e das maneiras nas quais o lipidoma muda com a diferenciação, doenças como o câncer ou tratamento com fármacos.

**TABELA 10-3** As oito principais categorias dos lipídeos biológicos

| Categoria | Código da categoria | Exemplos |
|---|---|---|
| Ácidos graxos | FA | Oleato, estearoil-CoA, palmitoilcarnitina |
| Glicerolipídeos | GL | Di e triacilgliceróis |
| Glicerofosfolipídeos | GP | Fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina |
| Esfingolipídeos | SP | Esfingomielina, gangliosídeo GM2 |
| Lipídeos de esterol | ST | Colesterol, progesterona e ácidos biliares |
| Lipídeos de prenol | PR | Farnesol, geraniol, retinol, ubiquinona |
| Sacarolipídeos | SL | Lipopolissacarídeo |
| Poliquetídeos | PK | Tetraciclina, eritromicina e aflatoxina $B_1$ |

Uma célula animal contém mais do que mil espécies diferentes de lipídeos, cada qual presumivelmente com uma função específica. Um crescente número de lipídeos possui suas funções conhecidas, mas a grande parte ainda inexplorada do lipidoma oferece uma rica fonte de novos problemas para a próxima geração de bioquímicos e biólogos celulares.

## RESUMO 10.4 Trabalhando com lipídeos

- Na determinação da composição de lipídeos, eles devem ser primeiro extraídos dos tecidos com solventes orgânicos e separados por cromatografias em camada delgada, gás-líquido ou de alto desempenho.
- Fosfolipases específicas para uma das ligações em um fosfolipídeo podem ser utilizadas para gerar compostos mais simples para análise subsequente.
- Os lipídeos individuais são identificados por seu comportamento cromatográfico, por sua suscetibilidade à hidrólise por enzimas específicas ou por espectrometria de massa.
- A espectrometria de massa de alta resolução permite a análise de misturas brutas de lipídeos sem pré-fracionamento.
- A lipidômica combina poderosas técnicas de análise para determinar o complemento completo dos lipídeos em uma célula ou tecido (o lipidoma) e para montar bases de dados de diferentes tipos celulares e sob diferentes condições.

## Termos-chave

*Os termos em negrito estão definidos no glossário.*



## Leituras adicionais

### Geral


**Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H.A., Glass, C.K., Merrill, A.H., Jr., Murphy, R.C., Raetz, C.R.H., Russell, D.W., Seyama, Y., Shaw, W., et al** (2005) A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res*. **46**, 839–862.

Novo sistema de nomenclatura para lipídeos biológicos, que os separa em oito categorias principais. A referência definitiva sobre a classificação de lipídeos.

**Gurr, M.I., Harwood, J.L., & Frayn, K.N.** (2002) *Lipid Biochemistry: An Introduction,* 5th edn, Blackwell Science Ltd., Oxford.

Boa fonte geral da estrutura e do metabolismo de lipídeos, de nível intermediário.

**Lipid Maps.** *Nature* Lipidomics Gateway, www.lipidmaps.org.

Tutoriais e aulas sobre a estrutura e a função lipídica, métodos lipidômicos e banco de dados sobre as estruturas e propriedades dos lipídeos.

**Vance, J.E. & Vance, D.E. (eds).** (2008) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes,* 5ed, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.

Excelente coleção de revisões sobre vários aspectos da estrutura, da biossíntese e da função dos lipídeos.


### Lipídeos como nutrientes


**Angerer, P. & von Schacky, C.** (2000) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and the cardiovascular system. *Curr. Opin. Lipidol*. **11**, 57–63.

**Covington, M.B.** (2004) Omega-3 fatty acids. *Am. Fam. Physician* **70**, 133–140.

Sucinto relato sobre a descoberta de que os ácidos graxos ômega-3 reduzem o risco de doenças cardiovasculares.

**de Logeril, M., Salen, P., Martin, J.L., Monjaud, I., Delaye, J., & Mamelle, N.** (1999) Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* **99**, 779–785.

**Lavie, C.J., Milani, R.V., Mehra, M.R., & Ventura, H.O.** (2009) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *J. Am. Coll. Cardiol*. **54**, 585–594.

**Mello, M.M.** (2009) New York City's war on fat. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2015– 2020.
Aspectos legais e éticos da proibição de ácidos graxos *trans* em restaurantes.

**Mozaffarian, D., Katan, M.B., Ascherio, P.H., Stampfer, M.J., & Willet, W.C.** (2006) Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1601–1613.
Um resumo da evidência de que os ácidos graxos *trans* da dieta predispõem à doença cardíaca coronária.

## Lipídeos estruturais em membranas

**Bogdanov, M. & Dowhan, W.** (1999) Lipid-assisted protein folding. *J. Biol. Chem.* **274**, 36,827–36,830.
Pequena revisão do papel dos lipídeos de membrana no enovelamento das proteínas de membrana.

**Dowhan, W.** (1997) Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 199–232.

**Jacquemet, A., Barbeau, J., Lemiegre, L., & Benvegnu, T.** (2009) Archaeal tetraether bipolar lipids: structures, functions and applications. *Biochimie* **91**, 711–717.

**Valle, D., Beaudet, A.L., Vogelstein, B.,Kinzler, K.W., Antonarakis, S.E., & Ballabio. A. (eds).** (2006) *Scriver's Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*, www.ommbid.com.
Essa enciclopédia médica clássica, editada em 2001 em um conjunto de quatro volumes, agora é mantida atualizada on-line. Contém descrições definitivas dos aspectos clínicos, bioquímicos e genéticos de centenas de doenças metabólicas humanas – uma fonte de credibilidade e uma leitura fascinante. A Parte 16: Distúrbios lissosomais inclui 24 artigos sobre várias doenças do metabolismo dos lipídeos.

## Lipídeos como sinalizadores, cofatores e pigmentos

**Bell, R.M., Exton, J.H., & Prescott, S.M. (eds).** (1996) *Lipid Second Messengers*, Handbook of Lipid Research, Vol. 8, Plenum Press, New York.

**Berkner, K.L. & Runge, K.W.** (2004) The physiology of vitamin K nutriture and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis. *J. Thromb. Haemost.* **2**, 2118–2132.

**Binkley, N.C. & Suttie, J.W.** (1995) Vitamin K nutrition and osteoporosis. *J. Nutr*. **125**, 1812–1821.

**Brigelius-Flohé, R. & Traber, M.G.** (1999) Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* **13**, 1145–1155.

**Chojnacki, T. & Dallner, G.** (1988) The biological role of dolichol. *Biochem. J.* **251**, 1–9.

**Clouse, S.D.** (2002) Brassinosteroid signal transduction: clarifying the pathway from ligand perception to gene expression. *Mol. Cell* **10**, 973–982.

**DeLuca, H.F.** (2008) Evolution of our understanding of vitamin D. *Nutr. Rev*. **66**, S73–S87.

**Dicke, M., van Loon, J.J.A., & Soler, R.** (2009) Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *Nat. Chem. Biol*. **5**, 317–324.

**Holick, M.F.** (2007) Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med*. **357**, 266–281.

**James, D.J., Khodthong, C., Kowalchyk, J.A., & Martin, T.F.** (2010) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulation of SNARE function in membrane fusion mediated by CAPS. *Adv. Enzyme Regul*. **50**, 62–70.

**Jones M.B., Rosenberg, J.N., Betenbaugh, M.J., & Krag, S.S.** (2009) Structure and synthesis of polyisoprenoids used in *N*-glycosylation across the three domains of life. *Biochim. Biophys. Acta* **1790**, 485–494.
Revisão em nível intermediário sobre o papel dos dolicóis na glicosilação.

**Lee, D.** (2007) *Nature's Palette: The Science of Plant Color*, University of Chicago Press, Chicago, IL.
Fascinante livro de nível intermediário sobre lipídeos como pigmentos biológicos.

**Rosen, H., Gonzalez-Cabrera, P.J., Sanna, M. G., & Brown, S.** (2009) Sphingosine 1-phosphate receptor signaling **78**, 743–768. *Annu. Rev. Biochem*.

**Suttie, J.W.** (1993) Synthesis of vitamin K-dependent proteins. *FASEB J.* **7**, 445–452.
Descreve a base bioquímica para a necessidade de vitamina K na coagulação sanguínea e a importância da carboxilação na síntese da trombina, a proteína da coagulação sanguínea.

**Weber, H.** (2002) Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci.* **7**, 217–224.

**Wymann, M.P. & Schneiter, R.** (2008) Lipid signaling in disease. *Nat. Rev.* ***Mol. Cell Biol***. 9, 162–176.

## Trabalhando com lipídeos

**Christie, W.W.** (1998) Gas chromatography–mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. *Lipids* **33**, 343–353.
Detalhada descrição dos métodos utilizados para obter dados como os apresentados na Figura 10-26.

**Christie, W.W.** (2003) *Lipid Analysis*, 3rd edn, The Oily Press, Bridgwater, England.

**Dennis, E.A., Deems, R.A., Harkewicz, R., Quehenberger, O., Brown, H.A., Milne, S.B., Myers, D.S., Glass, C.K., Hardiman, G., Reichart, D., et al.** (2010) A mouse macrophage lipidome. *J. Biol. Chem.* **285**, 39,976–39,985.
Artigo científico que descreve as variações do lipidoma de macrófagos.

**Harkewicz, R. & Dennis, E.A.** (2011) Applications of mass spectrometry to lipids and membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 301–325.
Discussão avançada sobre a espectroscopia de massa e lipidômica.

**Murphy, R.C. & Gasskell, S.J.** (2011) New applications of mass spectrometry in lipid analysis. *J. Biol. Chem.* **286**, 25,427–25,433.

**Watson, A.D.** (2006) Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. *J. Lipid Res*. **47**, 2101–2111.
Revisão de nível intermediário das classes de lipídeos, seus métodos de extração e separação e os métodos de identificação e quantificação de todos os lipídeos de uma determinada célula, tecido ou organela por espectrometria de massa.

# Problemas

**1. Definição operacional de lipídeos.** De que maneira a definição de "lipídeo" difere dos tipos de definição utilizados para outras biomoléculas como os aminoácidos, os ácidos nucleicos e as proteínas?

**2. Pontos de fusão dos lipídeos.** Os pontos de fusão de uma série de ácidos graxos de 18 carbonos são: ácido esteárico, 69,6°C; ácido oleico, 13,4°C; ácido linoleico, –5 °C; e ácido linolênico, –11°C.

(a) Que aspecto estrutural desses ácidos graxos de 18 carbonos pode ser correlacionado com o ponto de fusão?

(b) Desenhe todos os triacilgliceróis possíveis que podem ser construídos a partir de glicerol, ácido palmítico e ácido oleico. Classifique-os em ordem crescente de ponto de fusão.

(c) Ácidos graxos de cadeia ramificada são encontrados em alguns lipídeos de membrana bacterianos. A sua presença aumenta ou diminui a fluidez das membranas (isto é, diminui ou aumenta o seu ponto de fusão)? Por quê?

**3. Preparação de molho *béarnaise*.** Durante a preparação do molho *béarnaise*, as gemas de ovo são incorporadas na manteiga derretida para estabilizar o molho e evitar a separação. O agente estabilizante nas gemas de ovo é a lecitina (fosfatidilcolina). Explique por que isso funciona.

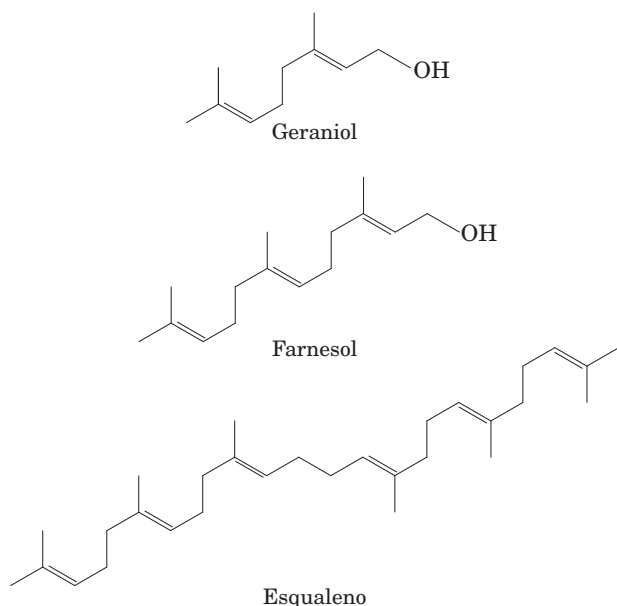
**4. Unidades de isopreno em isoprenoides.** O geraniol, o farnesol e o esqualeno são chamados de isoprenoides porque são sintetizados a partir de unidades isopreno de cinco carbonos. Em cada composto, circule as unidades de cinco carbonos representando as unidades de isopreno (ver Figura 10-22).

OH

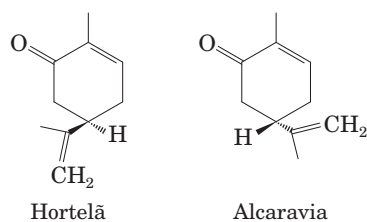
Geraniol

OH

Farnesol

Esqualeno

**5. Denominando os estereoisômeros de lipídeos.** Os dois compostos abaixo são estereoisômeros da carvona com propriedades bem diferentes; o da esquerda tem cheiro de hortelã e o da direita tem cheiro de alcaravia. Denomine os compostos utilizando o sistema RS.

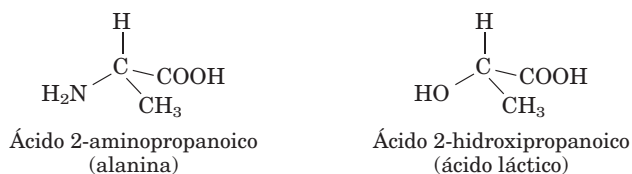
O H $CH_2$ Hortelã

O H $CH_2$ Alcaravia

**6. Designação RS para a alanina e o lactato.** Desenhe, utilizando a notação de fórmula em perspectiva, e indique os isômeros (*R*) e (*S*) do ácido 2-aminopropanoico (alanina) e do ácido 2-hidroxipropanoico (ácido láctico).

H C COOH $H_2N$ $CH_3$

Ácido 2-aminopropanoico (alanina)

H C COOH HO $CH_3$

Ácido 2-hidroxipropanoico (ácido láctico)

**7. Componentes hidrofóbicos e hidrofílicos dos lipídeos de membrana.** Uma característica estrutural comum dos lipídeos de membrana é a sua natureza anfipática. Por exemplo, na fosfatidilcolina, as duas cadeias de ácidos graxos são hidrofóbicas e o grupo cabeça fosfocolina é hidrofílico. Para cada um dos próximos lipídeos de membrana, denomine os componentes que servem como unidades hidrofóbica e hidrofílica: (a) fosfatidiletanolamina; (b) esfingomielina; (c) galactosilcerebrosídeo; (d) gangliosídeo; (e) colesterol.

**8. Estrutura do ácido graxo ômega-6.** Desenhe a estrutura do ácido graxo ômega-6 16:1.

**9. Hidrogenação catalítica dos óleos.** A hidrogenação catalítica, utilizada na indústria alimentícia, converte as ligações duplas nos ácidos graxos dos triacilgliceróis do óleo a $–CH_2–CH_2–$. Como isso afeta as propriedades físicas dos óleos?

**10. Labilidade alcalina dos triacilgliceróis.** Um procedimento comum para limpar a caixa de gordura da pia de cozinha consiste em adicionar um produto que contém hidróxido de sódio. Explique por que isso funciona.

**11. Deduzindo a estrutura lipídica a partir da composição.** A análise da composição de certo lipídeo mostra que ele tem exatamente um mol de ácido graxo por mol de fosfato inorgânico. Ele pode ser um glicerofosfolipídeo? Um gangliosídeo? Uma esfingomielina?

**12. Deduzindo a estrutura do lipídeo a partir da proporção molar dos componentes.** A hidrólise completa de um glicerofosfolipídeo gera glicerol, dois ácidos graxos (16:1[$\Delta^9$] e 16:0), ácido fosfórico e serina em proporção molar 1:1:1:1:1. Denomine esse lipídeo e desenhe sua estrutura.

**13. Impermeabilidade das ceras.** Que propriedade das cutículas cerosas que recobrem as folhas das plantas deixa a cutícula impermeável à água?

**14. Ação das fosfolipases.** As peçonhas de uma espécie de cascavel (*Crotalus adamanteus*) e a da naja da Índia contêm a fosfolipase $A_2$, que catalisa a hidrólise de ácidos graxos na posição C-2 dos glicerofosfolipídeos. O produto da degradação do fosfolipídeo dessa reação é a lisolecitina (lecitina é a fosfatidilcolina). Em altas concentrações, esse e outros lisofosfolipídeos atuam como detergentes, dissolvendo as membranas dos eritrócitos e lisando as células. A hemólise em grandes proporções pode pôr a vida em risco.

(a) Todos os detergentes são anfipáticos. Quais são as porções hidrofílicas e hidrofóbicas da lisolecitina?

(b) A dor e a inflamação causadas pela mordida de cobra podem ser tratadas com certos esteroides. Em que se fundamenta esse tratamento?

(c) Embora os altos níveis de fosfolipase $A_2$ na peçonha possam ser letais, essa enzima é necessária para vários processos metabólicos normais. Quais são eles?

**15. Os lipídeos na determinação do grupo sanguíneo.** Foi visto na Figura 10-15 que a estrutura dos glicoesfingolipídeos determina os grupos sanguíneos A, B e O em humanos. Também é verdade que as glicoproteínas determinam os grupos sanguíneos. Como podem ambas as afirmações serem verdadeiras?

**16. Mensageiros intracelulares dos fosfatidilinositóis.** Quando o hormônio vasopressina estimula a clivagem de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato pela fosfolipase C sensível a hor-

mônios, dois produtos são formados. Quais são eles? Compare suas propriedades e suas solubilidades em água e prediga se algum deles se difundiria rapidamente no citosol.

**17. Armazenamento de vitaminas lipossolúveis.** Ao contrário das vitaminas hidrossolúveis, que devem ser parte da nossa dieta diária, as vitaminas lipossolúveis podem ser armazenadas no corpo em quantidades suficientes para muitos meses. Sugira uma explicação para essa diferença.

**18. Hidrólise de lipídeos.** Denomine os produtos da hidrólise branda com NaOH diluído do (a) 1-estearoil-2,3-dipalmitoilglicerol; (b) 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina.

**19. Efeitos da polaridade na solubilidade.** Classifique as moléculas seguintes em ordem crescente de solubilidade em água: um triacilglicerol, um diacilglicerol e um monoacilglicerol, todos contendo apenas ácido palmítico.

**20. Separação cromatográfica de lipídeos.** Uma mistura de lipídeos é aplicada a uma coluna de sílica gel, que é então lavada com solventes de polaridade crescente. A mistura consiste em fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, palmitato de colesteril (éster de esterol), esfingomielina, palmitato, *n*-tetradecanol, triacilglicerol e colesterol. Em que ordem os lipídeos vão eluir da coluna? Explique o seu raciocínio.

**21. Identificação de lipídeos desconhecidos.** Johann Thudichum, que exercia medicina em Londres cerca de 100 anos atrás, também se aventurava na química de lipídeos em seu tempo livre. Ele isolou uma variedade de lipídeos do tecido neural e caracterizou e identificou muitos deles. Seus frascos dos lipídeos isolados cuidadosamente selados e identificados foram redescobertos muitos anos depois.

(a) Como você confirmaria, usando técnicas não disponíveis para Thudichum, que os frascos identificados como "esfingomielina" e "cerebrosídeo" realmente continham esses compostos?

(b) Como você distinguiria a esfingomielina da fosfatidilcolina por testes químicos, físicos ou enzimáticos?

**22. Ninhidrina para detectar lipídeos em placas de TLC.** A ninhidrina reage especificamente com aminas primárias para formar um produto roxo-azulado. Um cromatograma em camada delgada de lipídeos do fígado de ratos é pulverizado com ninhidrina e deixa-se que a coloração se desenvolva. Quais fosfolipídeos podem ser detectados dessa forma?

## Problema de análise de dados

**23. Determinando a estrutura do lipídeo anormal na doença de Tay-Sachs.** A Figura Q-1 do Quadro 10-1 mostra a rota de degradação de gangliosídeos em indivíduos saudáveis (normais) e em indivíduos com certas doenças genéticas. Alguns dos dados nos quais a figura está baseada foram apresentados em um artigo de Lars Svennerholm (1962). Observe que o açúcar Neu5Ac, o ácido *N*-acetilneuramínico, representado na figura do Quadro 10-1 como ◆, é um ácido siálico.

Svennerholm relatou que "aproximadamente 90% dos monosialiogangliosídeos isolados do cérebro de uma pessoa normal" consistiam em um composto com ceramida, hexose, *N*-acetilgalactosamina e ácido *N*-acetilneuramínico na proporção molar de 1:3:1:1.

(a) Qual dos gangliosídeos (GM1 a GM3 e globosídeo) da Figura Q-1 do Quadro 10-1 se encaixa nessa descrição? Explique o seu raciocínio.

(b) Svennerholm relatou que 90% dos gangliosídeos de um paciente com a doença de Tay-Sachs tinham uma proporção molar (dos mesmos quatro componentes dados anteriormente) de 1:2:1:1. Isso é consistente com a figura do Quadro 10-1? Explique o seu raciocínio.

Para determinar a estrutura em maior detalhe, Svennerholm tratou os gangliosídeos com neuraminidase para remover o ácido *N*-acetilneuramínico. Isso resultou em um asialogangliosídeo que era muito mais fácil de analisar. Ele hidrolisou-o com ácido, coletou os produtos que continham ceramida e determinou a proporção molar dos açúcares em cada produto. Ele fez isso tanto para os gangliosídeos de pessoas normais quanto para os daquelas com a doença de Tay-Sachs. Os seus resultados são mostrados abaixo.

| Gangliosídeo | Ceramida | Glicose | Galactose | Galactosamina |
|---|---|---|---|---|
| *Normal* | | | | |
| Fragmento 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Fragmento 2 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Fragmento 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Fragmento 4 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| *Tay-Sachs* | | | | |
| Fragmento 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Fragmento 2 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Fragmento 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |

(c) Com base nesses dados, o que você pode concluir sobre a estrutura do gangliosídeo normal? Isso é consistente com a estrutura no Quadro 10-1? Explique o seu raciocínio.

(d) O que você pode concluir sobre a estrutura do gangliosídeo de Tay-Sachs? Isso é consistente com a estrutura no Quadro 10-1? Explique o seu raciocínio.

Svennerholm também relatou o trabalho de outros pesquisadores que "permetilaram" o asialogangliosídeo normal. Permetilação é o mesmo que uma metilação exaustiva: um grupo metil é adicionado a todos os grupos hidroxila de um açúcar. Eles encontraram os seguintes açúcares permetilados: 2,3,6-trimetilglicopiranose; 2,3,4,6-tetrametilgalactopiranose; 2,4,6-trimetilgalactopiranose; e 4,6-dimetil-2-desóxi-2-aminogalactopiranose.

(e) A qual açúcar do GM1 cada um dos açúcares permetilados corresponde? Explique o seu raciocínio.

(f) Com base em todos os dados apresentados até aqui, que partes de informação sobre a estrutura do gangliosídeo normal estão faltando?

### Referência

**Svennerholm, L.** (1962) The chemical structure of normal human brain and Tay-Sachs gangliosides. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 436-441.

11

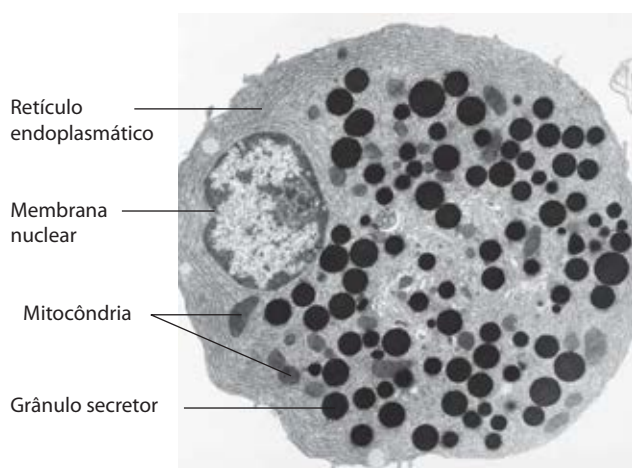
# Membranas Biológicas e Transporte



A primeira célula provavelmente passou a existir quando uma membrana se formou, envolvendo um pequeno volume de solução aquosa e separando-a do resto do universo. Membranas definem os limites externos das células e controlam o tráfego molecular por esses limites (**Figura 11-1**); em células eucarióticas, elas dividem o espaço interno em compartimentos para separar processos e componentes. Organizam sequências de reações complexas e são fundamentais tanto para a conservação de energia biológica quanto para a comunicação célula-célula. As atividades biológicas das membranas devem-se às suas propriedades físicas notáveis. As membranas são flexíveis, autosselantes e seletivamente permeáveis a solutos polares. A flexibilidade das membranas permite que a forma mude ao acompanhar o crescimento e o movimento da célula (como no movimento ameboide). Com a sua capacidade de se romper e resselar, duas membranas podem se fundir, como na exocitose, ou um compartimento envolvido por uma única membrana pode sofrer fissão e produzir dois compartimentos selados, como na endocitose ou na divisão celular, sem gerar grandes vazamentos através das superfícies celulares. Pelo fato de serem seletivamente permeáveis, as membranas retêm certos compostos e íons dentro das células e dentro de compartimentos celulares específicos, enquanto excluem outros.

**FIGURA 11-1** **Membranas biológicas.** Esta micrografia eletrônica de uma célula do pâncreas exócrino em secção fina mostra vários compartimentos formados ou circundados por membranas: o retículo endoplasmático, a mitocôndria, os grânulos secretores e a membrana nuclear.

As membranas não são barreiras meramente passivas. Elas incluem um arranjo de proteínas especializadas na promoção ou catálise de vários processos celulares. Na superfície celular, transportadores movem solutos orgânicos e íons inorgânicos específicos através da membrana; receptores captam sinais extracelulares e disparam mudanças moleculares na célula; moléculas de adesão mantêm células vizinhas juntas. Dentro da célula, as membranas organizam processos celulares como a síntese de lipídeos e certas proteínas, assim como a transdução de energia na mitocôndria e nos cloroplastos. Por consistirem em apenas duas camadas de moléculas, as membranas são muito finas – essencialmente bidimensionais. Colisões intermoleculares são muito mais prováveis nesse espaço bidimensional do que em um espaço tridimensional, de forma que a eficiência dos processos catalisados por enzimas organizados dentro das membranas é muito aumentada.

Este capítulo primeiro descreve a composição das membranas celulares e a sua arquitetura química – as estruturas moleculares que propiciam suas funções biológicas. A seguir, serão consideradas as características dinâmicas notáveis das membranas, nas quais lipídeos e proteínas movem-se em relação uns aos outros. A adesão celular, a endocitose e a fusão de membrana que acompanham a secreção de neurotransmissores ilustram o papel dinâmico das proteínas de membrana. Então segue para a passagem de solutos mediada por proteínas através da membrana via transportadores e canais iônicos. Em capítulos seguintes, serão discutidos o papel das membranas na transdução de sinal (Capítulos 12 e 23), a transdução de energia (Capítulo 19), a síntese de lipídeos (Capítulo 21) e a síntese de proteínas (Capítulo 27).

## 11.1 Composição e arquitetura das membranas

Uma abordagem para se compreender a função da membrana é estudar sua composição – determinar, por exemplo, quais componentes são comuns a todas as membranas e quais são exclusivos a membranas com funções específicas. Assim, antes de descrever a estrutura e a função da membrana, cabe analisar seus componentes moleculares: proteínas e lipídeos polares, que são responsáveis por quase toda a massa das membranas biológicas, e carboidratos, presentes como parte de glicoproteínas e glicolipídeos.

### Cada tipo de membrana tem proteínas e lipídeos característicos

A proporção relativa de proteína e lipídeo varia de acordo com o tipo da membrana (Tabela 11-1), refletindo a diversidade das funções biológicas. Por exemplo, certos neurônios têm uma bainha de mielina – uma extensão da membrana plasmática que se enrola ao redor da célula várias vezes e age como isolante elétrico passivo. A bainha de mielina consiste principalmente em lipídeos, enquanto membranas plasmáticas de bactérias e membranas de mitocôndrias e cloroplastos, sítios de muitos processos catalisados por enzimas, contêm mais proteínas do que lipídeos (em massa por massa total).

Para os estudos de composição da membrana, a primeira tarefa é isolar uma membrana selecionada. Quando células eucarióticas são sujeitas à ruptura mecânica, suas membranas plasmáticas rompem-se e fragmentam-se, liberando componentes citoplasmáticos e organelas ligadas à membrana como mitocôndrias, cloroplastos, lisossomos e núcleos. Organelas intactas e fragmentos de membranas plasmáticas podem ser isolados com o uso das técnicas descritas no Capítulo 1 (ver Figura 1-8) e no Problema Resolvido 2-1 (p. 57).

Claramente as células têm mecanismos para controlar os tipos e as quantidades de lipídeos de membrana que elas sintetizam, bem como para direcionar lipídeos específicos a organelas particulares. Todos os reinos, todas as espécies, todos os tecidos ou tipos celulares e as organelas de cada tipo celular têm um conjunto característico de lipídeos de membrana. Membranas plasmáticas, por exemplo, são enriquecidas com colesterol e não contêm cardiolipinas detectáveis (**Figura 11-2**); membranas mitocondriais contêm muito pouco colesterol e esfingolipídeos, mas contêm fosfatidilglicerol e cardiolipina, que são sintetizados dentro da mitocôndria. Exceto por alguns poucos casos, o significado funcional dessas combinações ainda não é conhecido.

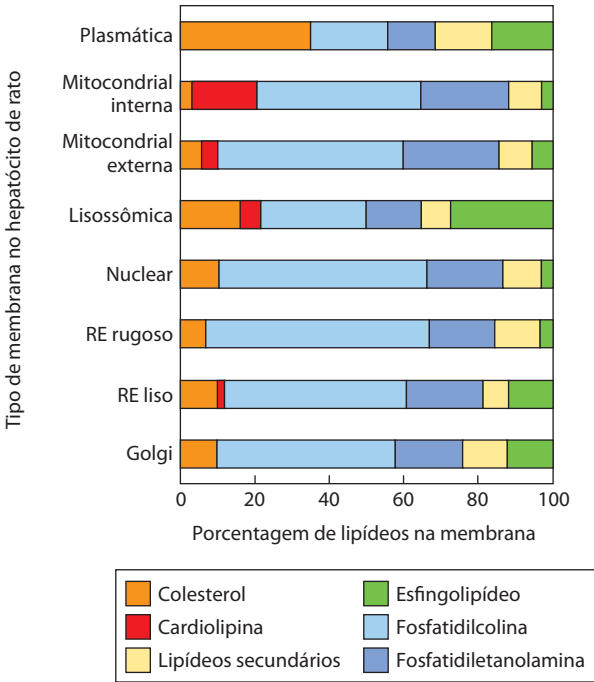



**FIGURA 11-2 Composição lipídica da membrana plasmática e membranas de organelas de hepatócito de rato.** A especialização funcional de cada tipo de membrana aparece refletida na sua composição lipídica única. O colesterol é proeminente na membrana plasmática, mas raramente é detectável em membranas mitocondriais. A cardiolipina é o principal componente da membrana mitocondrial interna, mas não da membrana plasmática. A fosfatidilserina, o fosfatidilinositol e o fosfatidilglicerol são componentes relativamente secundários na maioria das membranas, mas exercem funções cruciais; o fosfatidilinositol e seus derivados, por exemplo, são importantes na transdução de sinal desencadeada por hormônios. Os esfingolipídeos, a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina estão presentes na maioria das membranas, porém em proporções variáveis. Os glicolipídeos, que são os principais componentes das membranas dos cloroplastos de plantas, estão praticamente ausentes nas células animais.

**TABELA 11-1** Principais componentes das membranas plasmáticas em vários organismos

| | Componentes (% por peso) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Proteína | Fosfolipídeo | Esterol | Tipo de esterol | Outros lipídeos |
| Bainha de mielina humana | 30 | 30 | 19 | Colesterol | Galactolipídeos, plasmalogênios |
| Fígado de camundongo | 45 | 27 | 25 | Colesterol | — |
| Folha do milho | 47 | 26 | 7 | Sitosterol | Galactolipídeos |
| Levedura | 52 | 7 | 4 | Ergosterol | Triacilgliceróis, ésteres de esteril |
| Paramécio (protista ciliado) | 56 | 40 | 4 | Estigmasterol | — |
| *E. coli* | 75 | 25 | 0 | — | — |

**Nota**: Os valores não totalizam 100% em nenhum dos casos, pois há outros componentes além de proteínas, fosfolipídeos e esteróis; as plantas, por exemplo, têm altos níveis de glicolipídeos.

A composição proteica das membranas de diferentes origens varia ainda mais amplamente do que a sua composição lipídica, refletindo uma especialização funcional. Além disso, algumas proteínas de membrana são covalentemente ligadas aos oligossacarídeos. Por exemplo, na glicoforina, glicoproteína da membrana plasmática do eritrócito, 60% de sua massa consiste em oligossacarídeos complexos covalentemente ligados a resíduos de aminoácidos específicos. Resíduos de Ser, Thr e Asn são os pontos de ligação mais comuns (ver Figura 7-30). As porções de açúcar das glicoproteínas de superfície influenciam o enovelamento das proteínas, assim como suas estabilidades e destinos intracelulares, desempenhando um papel significativo na interação específica de ligantes com os receptores glicoproteicos de superfície (ver Figura 7-37).

Algumas proteínas de membrana são covalentemente ligadas a um ou mais lipídeos, que servem como âncoras hidrofóbicas para fixar as proteínas à membrana, como ainda será visto.

## Todas as membranas biológicas compartilham algumas propriedades fundamentais

As membranas são impermeáveis para a maioria dos solutos polares ou carregados, mas são permeáveis a compostos apolares. Elas têm de 5 a 8 nm (50 a 80 Å) de espessura quando proteínas protuberantes em ambos os lados são incluídas e apresentam aparência trilaminar quando vistas em secção transversal em microscópio eletrônico. A evidência conjunta por microscopia eletrônica e estudos da composição química, assim como estudos físicos da permeabilidade e do movimento de moléculas proteicas e lipídicas individuais em membranas, levou ao desenvolvimento do **modelo do mosaico fluido** para a estrutura das membranas biológicas (**Figura 11-3**). Os fosfolipídeos formam uma bicamada na qual as regiões apolares das moléculas lipídicas em cada camada são orientadas para o centro da bicamada e seus grupos polares são orientados para fora, interagindo com a fase aquosa de cada lado. As proteínas estão embebidas nessa lâmina da bicamada, mantidas por interações hidrofóbicas entre os lipídeos de membrana e os domínios hidrofóbicos nas proteínas. Algumas proteínas projetam-se apenas de um lado da membrana, enquanto outras expõem seus domínios em ambos os lados. A orientação das proteínas na bicamada é assimétrica, conferindo à membrana uma "lateralização": os domínios proteicos expostos em um lado da membrana são diferentes daqueles expostos do outro lado, refletindo uma assimetria funcional. As unidades lipídicas e proteicas individuais na membrana formam um mosaico fluido com um padrão que, ao contrário de um mosaico de ladrilhos de cerâmica em argamassa, é livre para mudar constantemente. O mosaico da membrana é fluido porque a maioria das interações entre seus componentes é não covalente, deixando moléculas proteicas e lipídicas livres para se movimentarem lateralmente no plano da membrana.

**FIGURA 11-3 Modelo do mosaico fluido para a estrutura da membrana plasmática.** As cadeias acil no interior da membrana formam uma região hidrofóbica fluida. As proteínas integrais flutuam nesse mar de lipídeos, mantidas por interações hidrofóbicas com as cadeias laterais de resíduos de seus aminoácidos apolares. Tanto as proteínas quanto os lipídeos são livres para se moverem lateralmente no plano da bicamada, mas o movimento de um lado ao outro da bicamada é restrito. As porções de carboidrato ligadas a algumas proteínas e lipídeos da membrana plasmática são expostas na superfície extracelular.

A seguir serão abordadas algumas das características do modelo do mosaico fluido em mais detalhes e analisadas as evidências experimentais que sustentam o modelo básico, mas que precisou ser aprimorado de várias formas.

## A bicamada lipídica é o elemento estrutural básico das membranas

Os glicerofosfolipídeos, os esfingolipídeos e os esteróis são praticamente insolúveis em água. Quando misturados com água, eles espontaneamente formam agregados lipídicos microscópicos, agrupando-se com suas porções hidrofóbicas em contato entre si e com seus grupos hidrofílicos interagindo com a água circundante. Esse agrupamento reduz a superfície hidrofóbica exposta à água e assim minimiza o número de moléculas da camada de água ordenada na interface lipídeo-água (ver Figura 2-7), resultando em aumento de entropia. Interações hidrofóbicas entre moléculas lipídicas provêm uma força propulsora termodinâmica para a formação e a manutenção desses agregados.

Dependendo das condições exatas e da natureza dos lipídeos, três tipos de agregados de lipídeos podem ser formados quando lipídeos anfipáticos são misturados com água (**Figura 11-4**). **Micelas** são estruturas esféricas que contêm desde poucas dúzias até alguns poucos milhares de moléculas anfipáticas. Essas moléculas dispõem-se com suas regiões hidrofóbicas agregadas na parte interna, enquanto a água é excluída, e com seus grupos polares hidrofílicos na superfície, em contato com a água. A formação de micelas é favorecida quando a área de secção transversal do grupo polar é maior do que da(s) cadeia(s) lateral(is) acil, como nos ácidos graxos, lisofosfolipídeos (fosfolipídeos com um ácido graxo a menos) e detergentes como o dodecil sulfato de sódio (SDS; p. 94).

Um segundo tipo de agregado lipídico na água é a **bicamada**, na qual duas camadas monolipídicas formam uma lâmina bidimensional. A formação da bicamada é favorecida quando as áreas de secção transversal dos grupos polares e as cadeias acil laterais são similares, como no caso dos glicerofosfolipídeos e dos esfingolipídeos. As porções hidrofóbicas em cada monocamada, excluídas da água, interagem

**FIGURA 11-4 Agregados lipídicos anfipáticos formados na água. (a)** Em micelas, as cadeias hidrofóbicas dos ácidos graxos são sequestradas no núcleo da esfera. Praticamente não há água no interior hidrofóbico. **(b)** Na bicamada aberta, todas as cadeias laterais acil, exceto aquelas das margens da lâmina, estão protegidas da interação com a água. **(c)** Quando a bicamada bidimensional se dobra sobre ela mesma, ela forma uma bicamada fechada, uma vesícula oca tridimensional (lipossomo) envolvendo uma cavidade aquosa.

entre si. Os grupos polares hidrofílicos interagem com a água em cada superfície da bicamada. Devido ao fato de as bordas das regiões hidrofóbicas (Figura 11-4b) estarem em contato com a água, a lâmina da bicamada é relativamente instável e dobra-se espontaneamente sobre si mesma para formar uma esfera oca, a **vesícula** (Figura 11-4c). A superfície contínua das vesículas elimina a exposição de regiões hidrofóbicas, permitindo às bicamadas alcançarem o máximo de estabilidade quando em meio aquoso. A formação de vesículas também cria compartimentos aquosos separados. É provável que os precursores das primeiras células vivas tenham apresentado semelhanças com as vesículas lipídicas, com seus conteúdos aquosos separados do meio circundante por uma casca hidrofóbica.

A bicamada lipídica tem 3 nm (30 Å) de espessura. O cerne hidrocarbonado, composto por $—CH_2—$ e $—CH_3$ dos grupos acil, é tão apolar quanto o decano, e vesículas formadas em laboratório a partir de lipídeos puros (lipossomos) são essencialmente impermeáveis a solutos polares, assim como é a bicamada lipídica de membranas biológicas (embora membranas biológicas, como será visto, sejam permeáveis a solutos para os quais tenham transportadores específicos).

Os lipídeos das membranas plasmáticas são distribuídos assimetricamente entre as duas lâminas da bicamada, embora a assimetria não seja absoluta, ao contrário das proteínas de membrana. Na membrana plasmática de eritrócito, por exemplo, lipídeos contendo colina (fosfatidilcolina e esfingomielina) geralmente são encontrados na lâmina externa (extracelular ou exoplasmática) (**Figura 11-5**), enquanto a fosfatidilserina, a fosfatidiletanolamina e os fosfatidilinositóis são muito mais comuns na lâmina interna (lado citoplasmático). O fluxo de componentes de membrana a partir do retículo endoplasmático – atravessando o aparelho de Golgi e rumando à membrana plasmática – via vesículas transportadoras, é acompanhado por mudanças na composição lipídica e disposição ao longo da membrana (**Figura 11-6**). A fosfatidilcolina é o principal fosfolipídeo no lúmen da monocamada da membrana do Golgi, mas em vesículas transportadoras, a fosfatidilcolina tem sido amplamente substituída por esfingolipídeos e colesterol, os quais, na fusão das vesículas transportadoras com a membrana plasmática, compõem a maioria dos lipídeos na monocamada externa da membrana plasmática.

Mudanças na distribuição dos lipídeos entre as lâminas da membrana plasmática geram consequências biológicas.

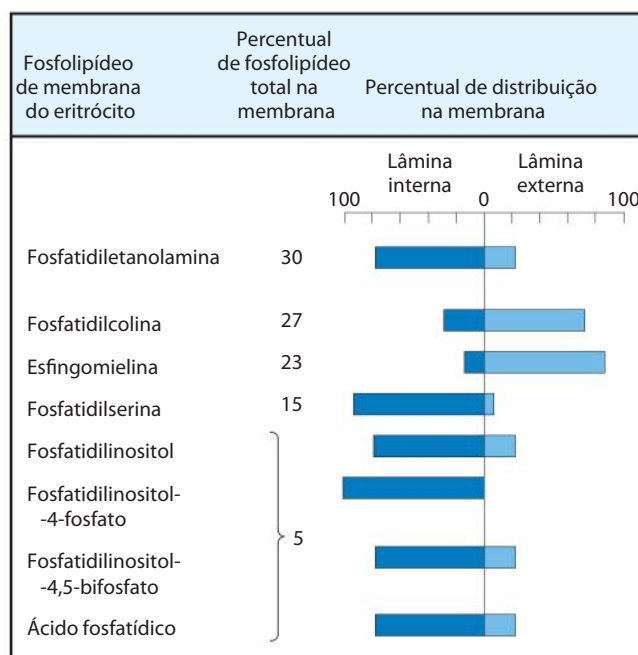



**FIGURA 11-5 Distribuição assimétrica de fosfolipídeos entre as monocamadas interna e externa da membrana plasmática de eritrócito.** A distribuição de um fosfolipídeo específico é determinada ao se tratar a célula intacta com fosfolipase C, que não pode alcançar os lipídeos da monocamada (lâmina) interna, mas remove os grupos polares das cabeças dos lipídeos na monocamada externa. A proporção de cada grupo polar liberado fornece uma estimativa da fração de cada lipídeo na monocamada externa.

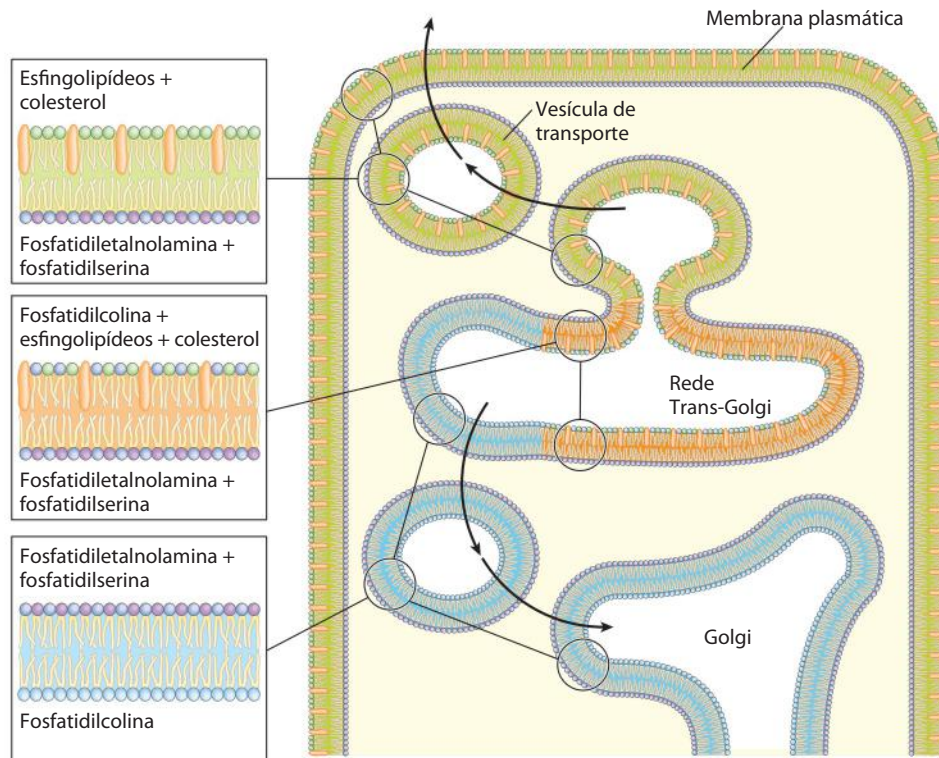



**FIGURA 11-6 A distribuição de lipídeos na membrana em uma célula típica.** Cada membrana tem sua composição característica própria, e as duas monocamadas de uma dada membrana podem também diferir quanto a sua composição.

Por exemplo, apenas quando a fosfatidilserina se move para a lâmina externa na membrana plasmática é que a plaqueta é capaz de exercer seu papel na formação de coágulo sanguíneo. Para muitos outros tipos celulares, a exposição da fosfatidilserina na superfície externa marca a célula para a destruição por morte celular programada. O movimento de moléculas de fosfolipídeos através da bicamada é catalisado e regulado por proteínas específicas (ver Figura 11-17).

## Três tipos de proteínas de membrana diferem quanto às suas associações com a membrana

**Proteínas integrais de membrana** são firmemente associadas à bicamada lipídica, sendo removíveis apenas por agentes que interferem com reações hidrofóbicas, como detergentes, solventes orgânicos, ou agentes desnaturantes (**Figura 11-7**). **Proteínas periféricas de membrana** associam-se à membrana por interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio com domínios hidrofílicos de proteínas integrais e com grupos polares dos lipídeos de mem-

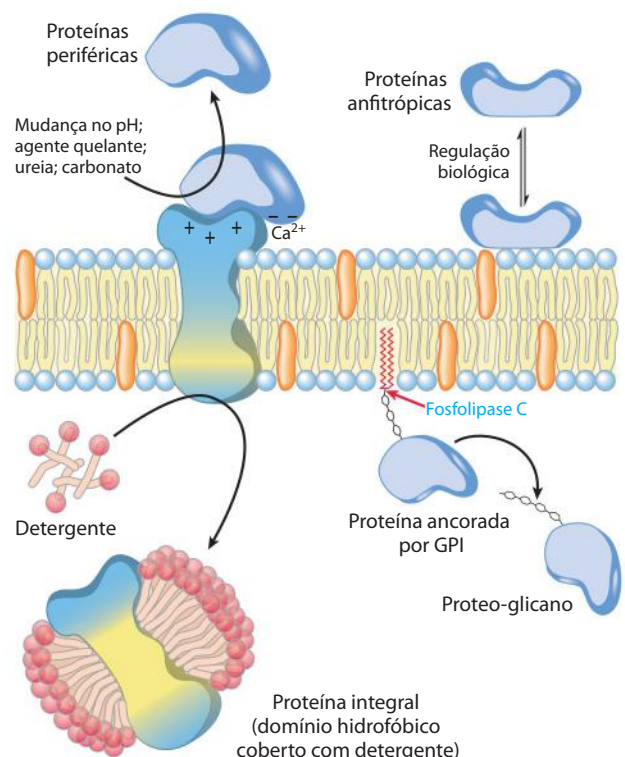



**FIGURA 11-7 Proteínas periféricas, integrais e anfitrópicas.** Proteínas de membrana podem ser operacionalmente distinguidas pelas condições requeridas para liberá-las da membrana. A maioria das proteínas periféricas é liberada com mudanças no pH ou na força iônica, pela remoção de cálcio por agentes quelantes, ou pela adição de ureia ou carbonato. As proteínas integrais podem ser extraídas com detergentes, que rompem as interações hidrofóbicas com a bicamada lipídica e formam agregados semelhantes a micelas ao redor das moléculas proteicas individuais. Proteínas integrais ligadas covalentemente a um lipídeo de membrana, como o glicosilfosfatidilinositol (GPI; ver Figura 11-15), podem ser liberadas pelo tratamento com fosfolipase C. Proteínas anfitrópicas algumas vezes são associadas com membranas, e algumas vezes não, dependendo de algum tipo de processo regulatório, como a palmitoilação reversível.

brana. Podem ser liberadas por tratamentos relativamente brandos que interferem com as interações eletrostáticas ou quebram as ligações de hidrogênio; um agente comumente usado é o carbonato com pH alto. **Proteínas anfitrópicas** são encontradas tanto no citosol quanto em associação com membranas. Suas afinidades pelas membranas resultam, em alguns casos, das interações não covalentes das proteínas com uma proteína ou lipídeo de membrana e, em outros casos, da presença de um ou mais lipídeos covalentemente ligados à proteína anfitrópica (ver Figura 11-15). Geralmente, a associação reversível das proteínas anfitrópicas com a membrana é regulada; por exemplo, a fosforilação ou a ligação de um ligante pode forçar a uma mudança conformacional na proteína, expondo o sítio de ligação da membrana inacessível anteriormente.

## Muitas proteínas de membrana atravessam a bicamada lipídica

A topologia das proteínas de membrana (a localização dos domínios da proteína em relação à bicamada lipídica) pode ser determinada com compostos que reagem com as cadeias laterais das proteínas, mas que não conseguem atravessar a membrana – compostos químicos polares que reagem com aminas primárias de resíduos Lys, por exemplo, ou enzimas como a tripsina que clivam proteínas, mas não conseguem atravessar a membrana. O eritrócito humano é conveniente para tais estudos, pois ele não tem organelas envolvidas por membranas; a membrana plasmática é a única membrana presente. Se a proteína de membrana de um eritrócito intacto reage com um composto impermeável à membrana, essa proteína deve ter no mínimo um domínio exposto à face externa (extracelular) da membrana. A tripsina cliva os domínios extracelulares, mas não afeta o domínio inserido dentro da bicamada ou exposto apenas à face interna, a menos que a membrana plasmática seja rompida de forma a tornar esses domínios acessíveis à enzima.

Experimentos com tais reagentes específicos para análise da topologia mostram que a glicoproteína de eritrócito **glicoforina** atravessa a membrana plasmática. Seu domínio aminoterminal (contendo as cadeias de carboidratos) está na superfície externa e é clivado pela tripsina. A extremidade carboxiterminal projeta-se para o interior da célula, onde não pode reagir com reagentes impermeantes. Tanto o domínio aminoterminal quanto o carboxiterminal contêm muitos resíduos de aminoácidos polares ou carregados e são, portanto, hidrofílicos. Entretanto, um segmento no centro da proteína (resíduos 75 a 93) contém muitos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, indicando que a glicoforina tenha um segmento transmembrana disposto conforme mostrado na **Figura 11-8**.

Esses experimentos não cristalográficos também revelaram que a orientação da glicoforina é assimétrica na membrana: seu segmento aminoterminal está sempre no lado de fora. Estudos semelhantes com outras proteínas de membrana mostram que cada uma delas tem uma orientação específica na bicamada, conferindo à membrana uma lateralidade distinta. Para a glicoforina e para todas as outras glicoproteínas de membrana plasmática, os domínios glicosilados são encontrados invariavelmente na face extracelular da bicamada. Como será visto, o arranjo assimétrico das proteínas de membrana resulta em uma assimetria funcional. Todas as moléculas de uma determinada bomba iônica, por exemplo, têm a mesma orientação na membrana e bombeiam íons na mesma direção.

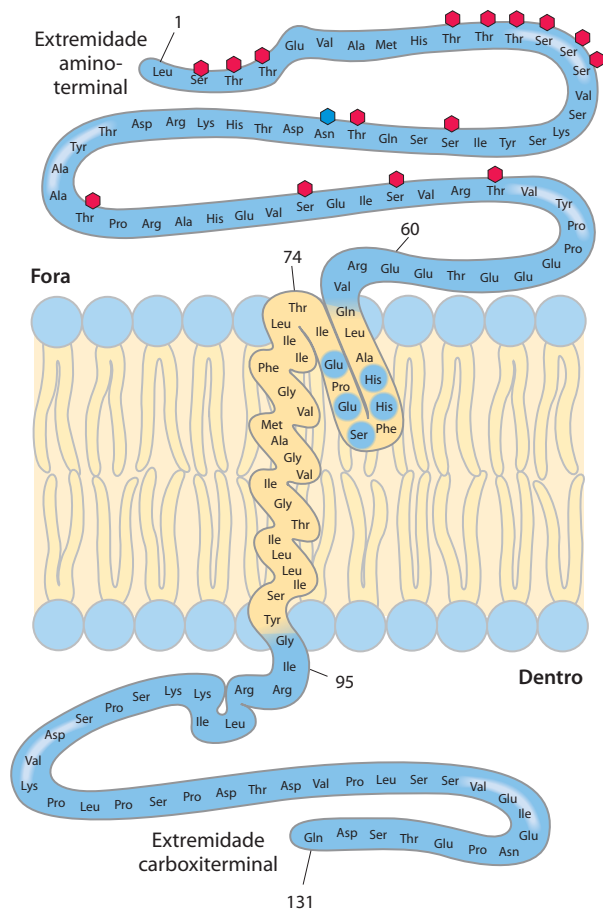



**FIGURA 11-8 Disposição transbicamada da glicoforina em um eritrócito.** Um domínio hidrofílico contendo todos os resíduos de açúcar encontra-se na superfície externa da membrana, e outro domínio hidrofílico projeta-se da face interna da membrana. Cada hexágono vermelho representa um tetrassacarídeo (contendo dois Neu5Ac [ácido siálico], Gal e GalNAc) ligado a um resíduo de Ser ou Thr; o hexágono azul representa um oligossacarídeo ligado a um resíduo de Asn. O tamanho relativo das unidades de oligossacarídeos é maior do que mostrado aqui. Um segmento de 19 resíduos hidrofóbicos (resíduos 75 a 93) forma uma hélice $\alpha$ que atravessa a bicamada da membrana (ver Figura 11-12a). O segmento formado pelos resíduos 64 a 74 tem alguns resíduos hidrofóbicos e provavelmente penetra a face externa da bicamada lipídica, como mostrado.

## As proteínas integrais são mantidas na membrana por meio de interações hidrofóbicas com lipídeos

A firme ligação das proteínas integrais à membrana é resultado de interações hidrofóbicas entre lipídeos de membrana e domínios hidrofóbicos das proteínas. Algumas proteínas têm uma única sequência hidrofóbica no meio (como a glicoforina) ou nas extremidades aminoterminal ou carboxiterminal. Outras têm sequências hidrofóbicas múltiplas, em que cada uma delas, quando em conformação $\alpha$-helicoi-

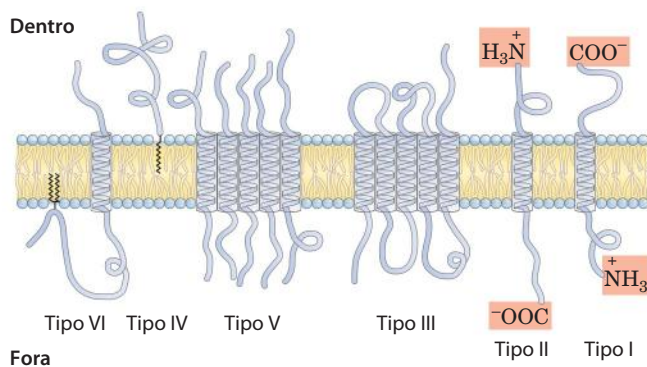



**FIGURA 11-9 Proteínas integrais de membrana.** Para proteínas de membrana plasmática conhecidas, as relações espaciais dos domínios das proteínas na bicamada lipídica se enquadram em seis categorias. As proteínas dos tipos I e II têm uma única hélice transmembrana; o domínio aminoterminal está fora da célula na proteína do tipo I e dentro na do tipo II. Proteínas do tipo III têm múltiplas hélices transmembrana em um único polipeptídeo. Em proteínas do tipo IV, os domínios transmembrana de vários polipeptídeos diferentes agrupam-se para formar um canal através da membrana. As proteínas do tipo V são sustentadas na bicamada em especial por lipídeos ligados covalentemente (ver Figura 11-15), e proteínas do tipo VI possuem tanto hélices transmembrana quanto âncoras lipídicas.

Nesta figura, e nas demais figuras deste livro, são representados os segmentos proteicos transmembrana em suas conformações mais prováveis: as hélices $\alpha$ com seis a sete voltas. Algumas vezes, essas hélices são mostradas apenas como cilindros. Como relativamente poucas estruturas proteicas de membrana foram deduzidas por cristalografia por raios X, a representação de domínios extramembrana é arbitrária e não se encontra necessariamente em escala.

**FIGURA 11-10 Bacteriorrodopsina, proteína que atravessa a membrana.** (PDB ID 2AT9) A cadeia polipeptídica única dobra-se em sete hélices $\alpha$ hidrofóbicas, cada uma das quais atravessa a bicamada lipídica de forma aproximadamente perpendicular ao plano da membrana. As sete hélices $\alpha$ transmembrana são agrupadas, e o espaço ao redor e entre elas é preenchido com cadeias acila dos lipídeos de membrana. O pigmento retinal que absorve a luz (ver Figura 10-21) está profundamente inserido na membrana em contato com vários segmentos helicoidais (não mostrado). As cores das hélices correspondem às do diagrama de hidropatia na Figura 11-12b.

dal, é longa o suficiente para atravessar a bicamada lipídica (**Figura 11-9**).

Uma das mais bem estudadas proteínas que atravessa a membrana, a bacteriorrodopsina, tem sete sequências internas muito hidrofóbicas, atravessando sete vezes a bicamada lipídica. A bacteriorrodopsina é uma bomba de prótons acionada pela luz, densamente empacotada em arranjos regulares na membrana roxa da bactéria *Halobacterium salinarum*. A cristalografia por raios X revela uma estrutura com sete segmentos $\alpha$-helicoidais, cada um deles atravessando a bicamada lipídica, conectados por alças não helicoidais nas faces interna e externa da membrana (**Figura 11-10**). Na sequência de aminoácidos da bacteriorrodopsina, podem ser identificados sete segmentos com aproximadamente 20 resíduos hidrofóbicos, cada um deles formando uma hélice $\alpha$ que atravessa a bicamada. As sete hélices estão aglomeradas e orientadas de modo não bem perpendicular ao plano da membrana, um padrão que (conforme será visto no Capítulo 12) é um motivo comum em proteínas de membrana envolvidas com recepção de sinal. Interações hidrofóbicas entre aminoácidos apolares e grupos acil graxos dos lipídeos de membrana ancoram firmemente a proteína à membrana.

Proteínas de membrana cristalizadas resolvidas (i.e., suas estruturas moleculares deduzidas) por cristalografia geralmente incluem moléculas de fosfolipídeos, o que presume estarem posicionadas nos cristais assim como estão nas membranas nativas. Muitas dessas moléculas de fosfolipídeos se encontram na superfície proteica, seus grupos polares interagindo com resíduos de aminoácidos polares nas interfaces água-membrana interna e externa e suas cadeias laterais associadas com resíduos apolares. Esses **lipídeos anelares** formam uma bicamada em forma de concha (ou em anel) ao redor da proteína, estando orientados de forma parecida ao esperado para os fosfolipídeos em uma bicamada (**Figura 11-11**). Outros fosfolipídeos são encontrados nas interfaces entre monômeros de proteínas de membrana de multissubunidades, onde eles formam um "selamento oleoso". Outros ainda estão inseridos no interior de uma proteína de membrana, geralmente com seus grupos polares bem abaixo do plano da bicamada. Por exemplo, a succinato-desidrogenase (complexo II, encontrado em mitocôndrias; ver Figura 19-10) tem várias moléculas de fosfolipídeos inseridas no seu interior.

## A topologia de uma proteína integral de membrana algumas vezes pode ser prevista a partir de sua sequência

A determinação da estrutura tridimensional de uma proteína de membrana – isto é, sua topologia – geralmente é muito mais difícil do que determinar sua sequência de aminoácidos, tanto diretamente quanto por sequenciamento do gene. As sequências de aminoácidos de milhares de proteínas de membrana são conhecidas, porém relativamente poucas estruturas tridimensionais têm sido estabelecidas por cristalografia ou espectroscopia por RMN. A presença de sequências intactas com mais de 20 resíduos hidrofóbicos em uma proteína de membrana em geral é tida como evidência de que essas sequências atravessam a bicamada lipídica, atuando como âncoras hidrofóbicas ou formando canais transmembrana. Praticamente todas as proteínas integrais têm pelo menos uma sequência desse tipo. A aplicação dessa lógica a sequências genômicas inteiras leva à conclusão de que, em muitas espécies, de 20 a 30% de todas as proteínas são proteínas integrais de membrana.

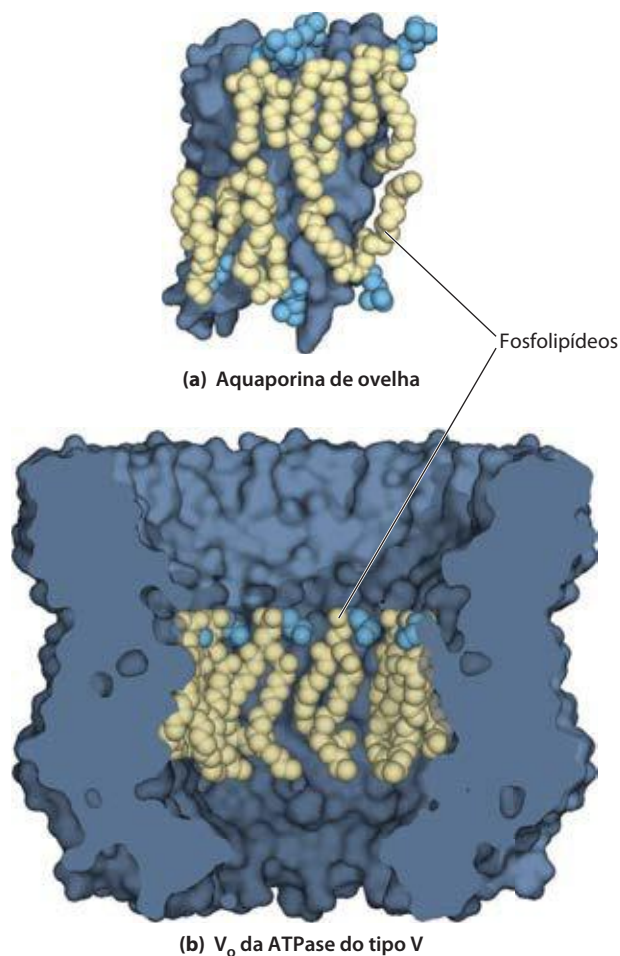



**FIGURA 11-11 Lipídeos anelares associados com duas proteínas integrais de membrana. (a)** A estrutura cristalina da aquaporina de ovelha (PDB ID 2B6O), um canal aquoso transmembrana, inclui uma camada de fosfolipídeos posicionados com seus grupos polares (em azul) nas posições esperadas nas superfícies interna e externa da membrana e suas cadeias acil hidrofóbicas (em dourado) associadas intimamente com a superfície da proteína exposta à bicamada. O lipídeo forma um "selamento oleoso" ao redor da proteína, que é ilustrado pela representação de uma superfície azul-escura. **(b)** A estrutura cristalina do complexo proteico integral $V_o$ da $Na^+$-ATPase do tipo V de *Enterococcus hirae* (PDB ID 2BL2) tem 10 subunidades idênticas, cada uma com quatro hélices transmembrana, que circundam uma cavidade central preenchida com fosfatidilglicerol (PG). Aqui, cinco das subunidades foram retiradas para expor as moléculas de PG associadas com cada subunidade ao redor do interior dessa estrutura.

O que é possível prever sobre a estrutura secundária das porções da proteína integral que atravessam a membrana? Uma sequência em hélice $\alpha$ de 20 a 25 resíduos é longa o suficiente para atravessar a espessura (30 Å) da bicamada lipídica (lembre-se que o comprimento de uma hélice $\alpha$ é de 1,5 Å [0,15 nm] por resíduo de aminoácido). Uma cadeia polipeptídica rodeada por lipídeos, sem moléculas de água às quais possa se ligar por ligações de hidrogênio, tende a formar hélices $\alpha$ ou folhas $\beta$, nas quais ligações de hidrogênio intracadeia são maximizadas. Se as cadeias laterais de todos os aminoácidos em uma hélice forem apolares, interações hidrofóbicas com lipídeos circundantes estabilizarão a hélice.

Vários métodos simples de análise de sequência de DNA geram previsões razoavelmente precisas quanto à estrutura secundária de proteínas transmembrana. A polaridade relativa de cada aminoácido tem sido determinada experimentalmente pela medida da variação de energia livre que acompanha o movimento da cadeia lateral do aminoácido de um solvente hidrofóbico para a água. Essa energia livre de transferência, que pode ser expressa como **índice de hidropatia** (ver Tabela 3-1), varia desde muito exergônica para resíduos carregados ou polares até muito endergônica para aminoácidos com cadeias laterais de hidrocarbonetos aromáticos ou alifáticos. O índice de hidropatia geral (hidrofobicidade) de uma sequência de aminoácidos é estimado pela soma das energias livres de transferência dos resíduos na sequência. Para examinar a sequência de um polipeptídeo para segmentos potenciais que atravessam a membrana, investigadores calculam o índice de hidropatia para segmentos sucessivos (chamados de janelas) de um determinado tamanho, de 7 a 20 resíduos. Para uma janela de sete resíduos, por exemplo, os índices médios para os resíduos 1 a 7, 2 a 8, 3 a 9, e assim por diante, são representados como na **Figura 11-12** (representado para o resíduo

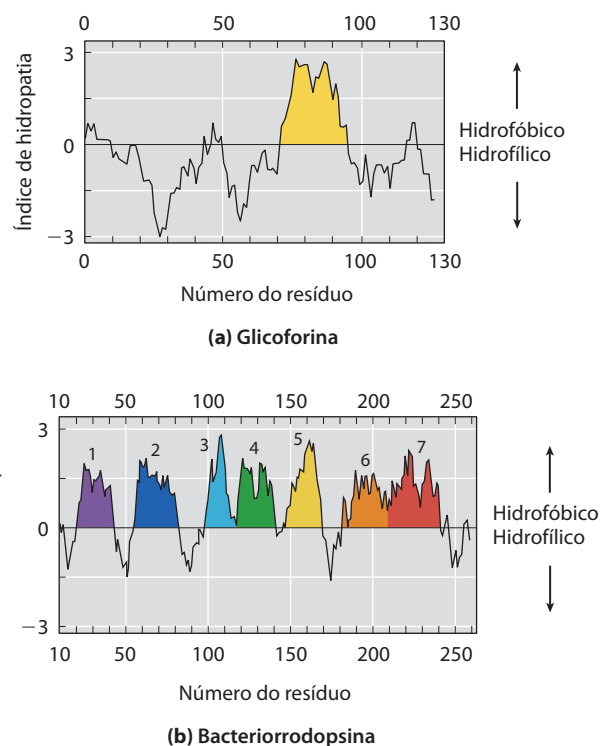



**FIGURA 11-12 Gráfico de hidropatia.** O índice de hidropatia médio (ver Tabela 3-1) é representado em relação ao número do resíduo para duas proteínas integrais de membrana. O índice de hidropatia para cada resíduo de aminoácido em uma sequência de comprimento definido, ou "janela", é usado para calcular a hidropatia média para aquela janela. O eixo horizontal mostra o número do resíduo no meio da janela. **(a)** A glicoforina de eritrócito humano tem uma única sequência hidrofóbica entre os resíduos 75 e 93 (em amarelo); compare isto com a Figura 11-8. **(b)** A bacteriorrodopsina, conhecida a partir de estudos físicos independentes por ter sete hélices transmembrana (ver Figura 11-10), tem sete regiões hidrofóbicas. Observe, entretanto, que o gráfico de hidropatia é ambíguo na região dos segmentos 6 e 7. A cristalografia por raios X confirmou que essa região tem dois segmentos transmembrana.

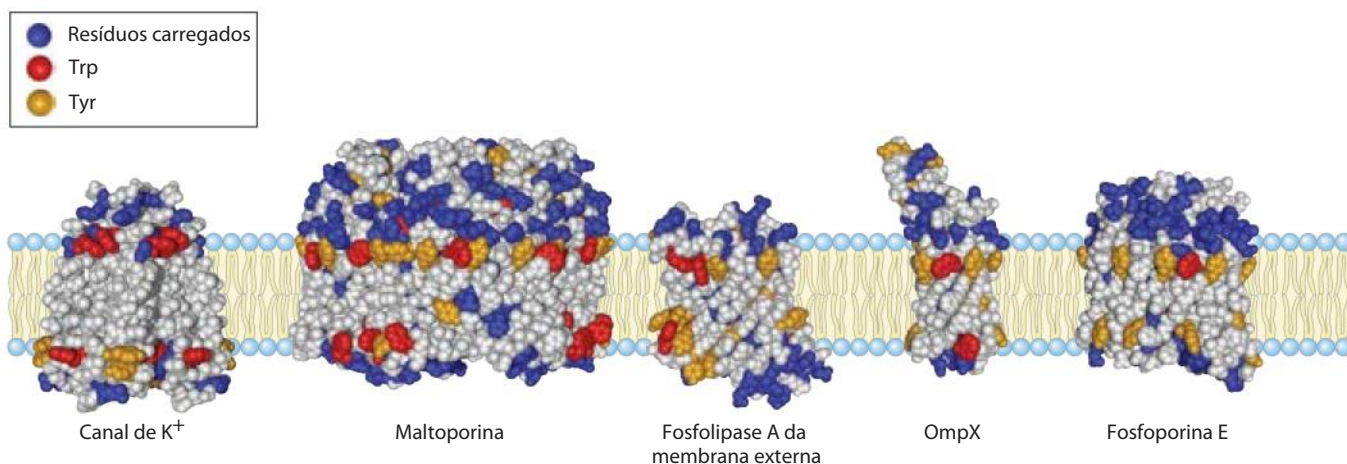



**FIGURA 11-13 Resíduos de Tyr e Trp de proteínas de membrana aglomerados na interface água-lipídeo.** As estruturas detalhadas dessas cinco proteínas integrais de membrana são conhecidas a partir de estudos cristalográficos. O canal de $K^+$ (PDB ID 1BL8) é da bactéria *Streptomyces lividans* (ver Figura 11-47); maltoporina (PDB ID 1AF6), a fosfolipase A da membrana externa (OmpLA PDB ID 1QD5), OmpX (PDB ID 1QJ9) e fosfoporina E (PDB ID 1PHO) são proteínas da membrana externa da *E. coli*. Resíduos de Tyr e Trp são predominantemente encontrados onde a região apolar das cadeias acil se encontra com a região do grupo polar. Resíduos carregados (Lys, Arg, Glu, Asp) são encontrados quase exclusivamente em fases aquosas.

do meio em cada janela – p. ex., resíduo 4 para resíduos de 1 a 7). Presume-se que uma região com mais de 20 resíduos com alto índice de hidropatia seja um segmento transmembrana. Quando as sequências de proteínas de membrana com estruturas tridimensionais conhecidas são examinadas dessa forma, é encontrada uma correspondência razoavelmente boa entre os segmentos conhecidos que atravessam a membrana e os previstos. A análise de hidropatia prevê uma hélice hidrofóbica única para a glicoforina (Figura 11-12a) e sete segmentos transmembrana para a bacteriorrodopsina (Figura 11-12b) – em concordância com os estudos experimentais.

Com base na sequência de aminoácidos e nos gráficos de hidropatia acredita-se que muitas das proteínas de transporte descritas neste capítulo tenham múltiplas regiões helicoidais que atravessam a membrana – ou seja, elas são proteínas integrais do tipo III ou IV (Figura 11-9). Quando as previsões são consistentes com os estudos químicos de localização proteica (como aqueles descritos anteriormente para a glicoforina e a bacteriorrodopsina), melhor justifica-se a suposição de que as regiões hidrofóbicas correspondam a domínios que atravessam a membrana.

Outra característica notável de muitas proteínas transmembrana com estrutura conhecida é a presença de resíduos de Tyr e Trp na interface entre lipídeo e água (**Figura 11-13**). As cadeias laterais desses resíduos servem aparentemente como âncoras na interface da membrana, capazes de interagir simultaneamente com a fase lipídica central e as fases aquosas em ambos os lados da membrana. Outra generalização sobre a localização do aminoácido em relação à bicamada é descrita como a **regra do positivo-dentro**: os resíduos positivamente carregados de Lys, His e Arg das proteínas de membrana ocorrem mais comumente na face citoplasmática das membranas.

Nem todas as proteínas integrais de membrana são compostas por hélices $\alpha$ transmembrana. Outro motivo estrutural comum em proteínas de membrana de bactérias é o **barril $\beta$** (ver Figura 4-18b), no qual 20 ou mais segmentos transmembrana formam folhas $\beta$ que guarnecem um cilindro (**Figura 11-14**). Os mesmos fatores que favorecem a formação de hélices $\alpha$ no interior hidrofóbico da bicamada lipídica também estabilizam os barris $\beta$: quando não há moléculas de água disponíveis para formar ligações de hidrogênio com o oxigênio do carbonil e o nitrogênio da ligação peptídica, o número máximo de ligações de hidrogênio intracadeia fornece a conformação mais estável. Folhas planares $\beta$ não maximizam essas interações e geralmente não são encontradas no interior da membrana. Os barris $\beta$ permitem todas as ligações de hidrogênio e são aparentemente comuns entre as proteínas de membrana. As **porinas**, proteínas que permitem que certos solutos polares atravessem a membrana externa de bactérias gram-negativas como a *E. coli*, têm barris $\beta$ com muitas fitas revestindo uma passagem polar transmembrana. A membrana externa de mitocôndrias e cloroplastos também contém uma variedade de barris $\beta$.

Um polipeptídeo é mais estendido na conformação $\beta$ do que em hélice $\alpha$; apenas sete a nove resíduos da conformação $\beta$ são necessários para atravessar a membrana.

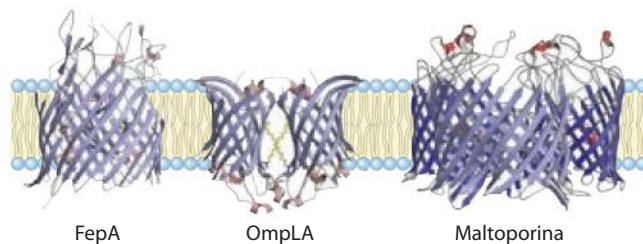



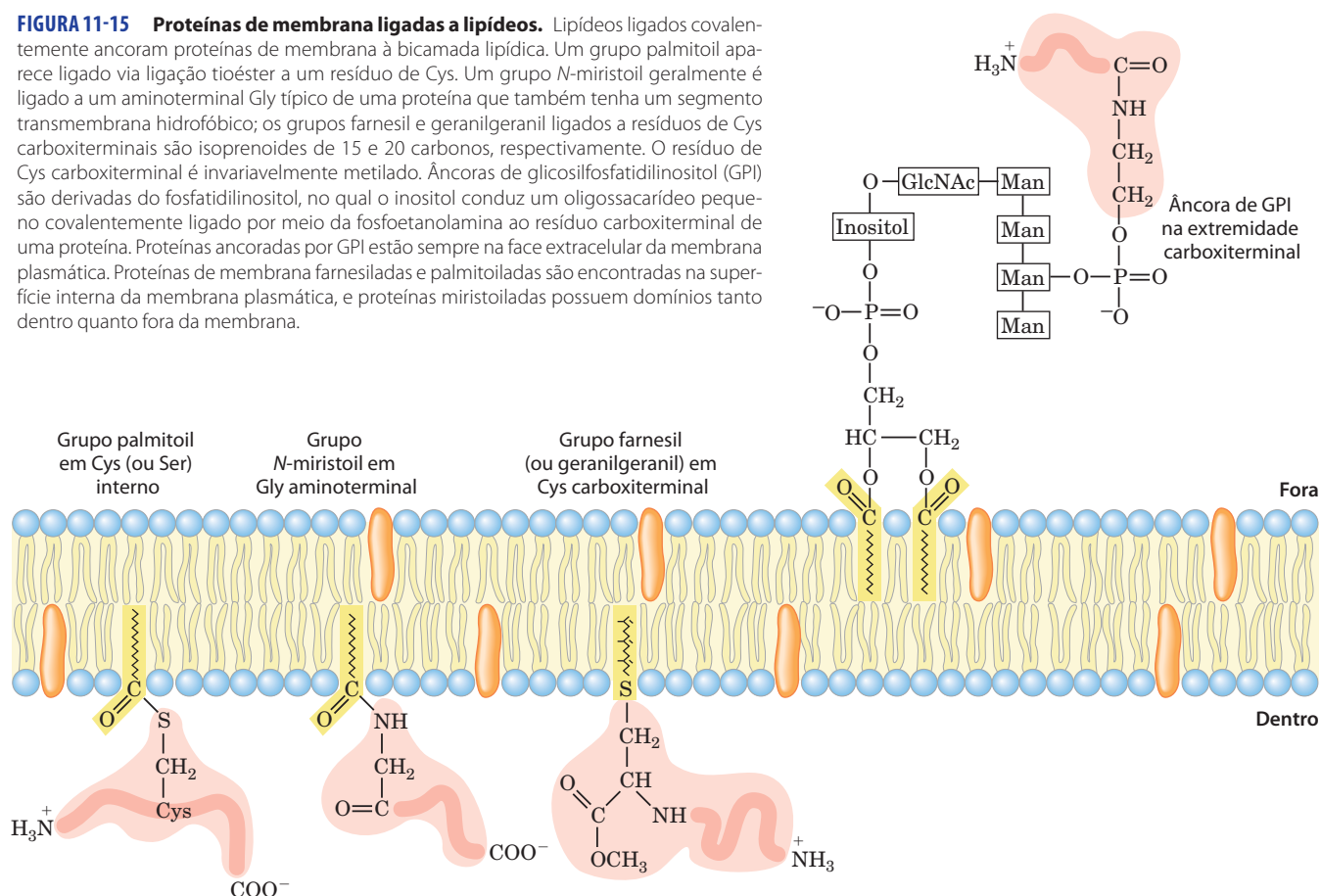
**FIGURA 11-14 Proteínas de membrana com estrutura de barril $\beta$.** Três proteínas da membrana externa da *E. coli* são mostradas, vistas no plano da membrana. A FepA (PDB ID 1FEP), envolvida com a captação de ferro, tem 22 fitas $\beta$ que atravessam a membrana. A OmpLA (derivada do PDB ID 1QD5), uma fosfolipase, é um barril $\beta$ de 12 fitas que existe como dímero na membrana. A maltoporina (derivada do PDB ID 1MAL), um transportador de maltose, é um trímero, em que cada monômero consiste em 16 fitas $\beta$.

Lembre que na conformação $\beta$ as cadeias laterais projetam-se alternadamente para cima e para baixo da folha (ver Figura 4-6). Nas fitas $\beta$ das proteínas de membrana, cada segundo resíduo do segmento que atravessa a membrana é hidrofóbico e interage com a bicamada lipídica; cadeias laterais aromáticas são comumente encontradas na interface lipídeo-proteína. Os outros resíduos podem ou não ser hidrofílicos. O gráfico de hidropatia não é útil na previsão de segmentos transmembrana para proteínas com motivos em barril $\beta$, mas à medida que os dados dos motivos conhecidos de barril $\beta$ aumentam, a previsão de conformações $\beta$ transmembrana com base na sequência torna-se factível. Por exemplo, a análise de sequência previu corretamente que algumas proteínas da membrana externa de bactérias gram-negativas (Figura 11-14) contêm barris $\beta$.

## Lipídeos ligados covalentemente ancoram algumas proteínas de membrana

Algumas proteínas de membrana contêm um ou mais lipídeos ligados covalentemente, que podem ser de vários tipos: ácidos graxos de cadeia longa, isoprenoides, esteróis ou derivados glicosilados do fosfatidilinositol (GPIs; **Figura 11-15**). O lipídeo anexado provê uma âncora hidrofóbica que se insere na bicamada lipídica e segura a proteína na superfície da membrana. A intensidade da interação hidrofóbica entre a bicamada e a cadeia de hidrocarboneto ligada a uma proteína é suficiente apenas para ancorar a proteína de forma segura, mas muitas proteínas têm mais de uma porção lipídica ligada. Outras interações, como a atração iônica de resíduos de Lys carregados positivamente nas proteínas e grupos polares carregados negativamente nos lipídeos, provavelmente contribuem para a estabilidade da ligação. A associação dessas proteínas ligadas a lipídeos com a membrana certamente é mais fraca do que a das proteínas integrais de membrana, sendo, pelo menos no caso da palmitoilação da cisteína, reversível.

O lipídeo ligado pode ter um papel mais específico além de meramente ancorar a proteína à membrana. Na membrana plasmática, proteínas com âncora de GPI estão exclusivamente no lado de fora da membrana e ficam agregadas em certas regiões, como discutido adiante no capítulo (p. 399), enquanto outros tipos de proteínas ligadas a lipídeos (ligadas a grupos farnesil ou geranilgeranil; Figura 11-15) estão exclusivamente na face interna. Em células epiteliais polarizadas (como as células epiteliais intestinais; ver Figura 11-43), nas quais as superfícies apicais e basais têm papéis diferentes, as proteínas ancoradas por GPI são direcionadas especificamente à superfície apical. A ligação de um lipídeo específico a uma proteína de membrana recém-sintetizada tem a função de orientar a proteína para sua localização correta na membrana.

**FIGURA 11-15 Proteínas de membrana ligadas a lipídeos.** Lipídeos ligados covalentemente ancoram proteínas de membrana à bicamada lipídica. Um grupo palmitoil aparece ligado via ligação tioéster a um resíduo de Cys. Um grupo *N*-miristoil geralmente é ligado a um aminoterminal Gly típico de uma proteína que também tenha um segmento transmembrana hidrofóbico; os grupos farnesil e geranilgeranil ligados a resíduos de Cys carboxiterminais são isoprenoides de 15 e 20 carbonos, respectivamente. O resíduo de Cys carboxiterminal é invariavelmente metilado. Âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) são derivadas do fosfatidilinositol, no qual o inositol conduz um oligossacarídeo pequeno covalentemente ligado por meio da fosfoetanolamina ao resíduo carboxiterminal de uma proteína. Proteínas ancoradas por GPI estão sempre na face extracelular da membrana plasmática. Proteínas de membrana farnesiladas e palmitoiladas são encontradas na superfície interna da membrana plasmática, e proteínas miristoiladas possuem domínios tanto dentro quanto fora da membrana.

## RESUMO 11.1 Composição e arquitetura das membranas

- As membranas biológicas definem limites celulares, dividem células em compartimentos separados, organizam sequências de reações complexas e atuam na recepção de sinal e na transformação de energia.
- As membranas são compostas por lipídeos e proteínas em combinações variáveis particulares para cada espécie, tipo celular e organela. A bicamada lipídica é a unidade estrutural básica.
- As proteínas periféricas de membrana são frouxamente associadas à membrana por interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio, ou por âncoras lipídicas ligadas covalentemente. As proteínas integrais associam-se firmemente à membrana por interações hidrofóbicas entre a bicamada lipídica e as suas cadeias laterais de aminoácidos apolares, que estão orientadas para o exterior da molécula proteica. Proteínas anfitrópicas associam-se reversivelmente com a membrana.
- Muitas proteínas de membrana atravessam várias vezes a bicamada lipídica, com sequências hidrofóbicas de cerca de 20 resíduos de aminoácidos formando hélices $\alpha$ transmembrana. Barris $\beta$ de muitas fitas também são comuns em proteínas integrais em membrana de bactérias. Resíduos de Tyr e Trp de proteínas transmembrana são comumente encontrados na interface lipídeo-água.
- Os lipídeos e as proteínas de membrana são inseridos na bicamada com lateralização específica; portanto, as membranas são estrutural e funcionalmente assimétricas. Glicoproteínas de membranas plasmáticas estão sempre orientadas com o domínio que apresenta oligossacarídeos na superfície extracelular.



**FIGURA 11-16 Dois estados extremos da bicamada lipídica. (a)** No estado ordenado líquido ($L_o$), os grupos polares das cabeças são arranjados uniformemente na superfície, e as cadeias acila quase não apresentam movimento, estando agrupadas em uma geometria regular. **(b)** No estado líquido desordenado ($L_d$), ou estado fluido, cadeias acila sofrem muito mais movimentação térmica e não apresentam organização regular. O estado dos lipídeos em membranas biológicas é mantido entre esses extremos.

## 11.2 Dinâmica da membrana

Uma característica marcante de todas as membranas biológicas é a sua flexibilidade – sua capacidade de mudar de forma sem perder sua integridade e gerar vazamento. A base dessa propriedade está nas interações não covalentes entre lipídeos na bicamada e na mobilidade permitida aos lipídeos individuais por não estarem covalentemente ancorados uns aos outros. Agora o foco será a dinâmica da membrana: os movimentos que ocorrem e as estruturas transitórias permitidas por esses movimentos.

### Grupos acil no interior da bicamada estão ordenados em graus variáveis

Embora a estrutura da bicamada lipídica seja estável, suas moléculas individuais de fosfolipídeos têm muita liberdade de movimento (**Figura 11-16**), dependendo da temperatura e da composição lipídica. Abaixo de temperaturas fisiológicas normais, os lipídeos formam **um estado líquido ordenado ($L_o$)** semissólido na bicamada, no qual todos os tipos de movimento de moléculas individuais estão fortemente limitados; a bicamada é paracristalina (Figura 11-16a). Acima de temperaturas fisiológicas, cadeias individuais de hidrocarbonetos de ácidos graxos estão em movimento constante produzido pela rotação em torno das ligações carbono-carbono das cadeias laterais acil longas e pela difusão lateral de moléculas lipídicas individuais no plano da bicamada. Esse é o **estado líquido desordenado ($L_d$)** (Figura 11-16b). Na transição do estado $L_o$ para o estado $L_d$, a forma e as dimensões gerais da bicamada são mantidas; o que muda é o grau de movimento (lateral e rotacional) permitido às moléculas lipídicas individuais.

Em temperaturas na faixa fisiológica para mamíferos (cerca de 20 a 40°C), ácidos graxos saturados de cadeia longa (como 16:0 e 18:0) tendem a agrupar-se em uma fase gel $L_o$, mas as dobras nos ácidos graxos insaturados (ver Figura 10-2) interferem com o agrupamento, favorecendo o estado $L_d$. Grupos acil graxos de cadeias mais curtas têm o mesmo efeito. O conteúdo de esterol de uma membrana (que varia muito de acordo com o organismo e a organela; Tabela 11-1) é outro determinante importante do estado do lipídeo. Esteróis (como o colesterol) apresentam efeitos paradoxais na fluidez da bicamada: eles interagem com fosfolipídeos contendo cadeias acil graxas insaturadas, compactando-as e limitando seus movimentos na bicamada. A associação de esteróis com esfingolipídeos e fosfolipídeos com cadeias acil graxas saturadas longas tende a fluidificar a bicamada, que sem o colesterol adotaria o estado $L_o$. Em membranas biológicas compostas por uma variedade de fosfolipídeos e esfingolipídeos, o colesterol tende a se associar com esfingolipídeos e formar regiões no estado $L_o$ rodeado por regiões pobres em colesterol no estado $L_d$ (ver discussão sobre balsas de membrana a seguir).

**TABELA 11-2** Composição de ácidos graxos de células de *E. coli* cultivadas a diferentes temperaturas

| | Porcentagem dos ácidos graxos totais* | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **10ºC** | **20ºC** | **30ºC** | **40ºC** |
| Ácido mirístico (14:0) | 4 | 4 | 4 | 8 |
| Ácido palmítico (16:0) | 18 | 25 | 29 | 48 |
| Ácido palmitoleico (16:1) | 26 | 24 | 23 | 9 |
| Ácido oleico (18:1) | 38 | 34 | 30 | 12 |
| Ácido hidroximirístico | 13 | 10 | 10 | 8 |
| Razão entre insaturados e saturados† | 2,9 | 2,0 | 1,6 | 0,38 |

**Fonte**: Dados de Marr, A.G. & Ingraham, J.L. (1962) Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli. J. Bacteriol* **84**, 1260.
* A composição exata de ácidos graxos depende não apenas da temperatura de crescimento, mas também do estágio de crescimento e da composição do meio de crescimento.
† Razões calculadas como porcentagem total de 16:1 mais 18:1 dividido pela porcentagem de 14:0 mais 16:0. O ácido hidroximirístico foi omitido deste cálculo.

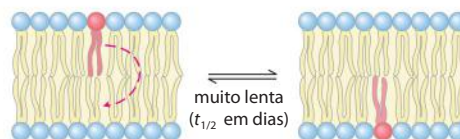
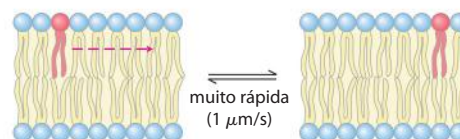
As células regulam sua composição lipídica para conseguir uma fluidez de membrana constante sob várias condições de crescimento. Por exemplo, bactérias sintetizam mais ácidos graxos insaturados e menos saturados quando cultivadas em baixas temperaturas quando comparadas àquelas cultivadas em temperaturas mais altas (Tabela 11-2). Como resultado desse ajustamento na composição lipídica, membranas de bactérias cultivadas em altas ou baixas temperaturas têm aproximadamente o mesmo grau de fluidez. Isso é presumivelmente essencial para a função de muitas proteínas – enzimas, transportadores e receptores – que atuam dentro da bicamada lipídica.

## O movimento de lipídeos transbicamada requer catálise

Em temperaturas fisiológicas, a difusão transbicamada – ou movimento de ponta-cabeça (*flip-flop*) – de uma molécula lipídica de uma lâmina da bicamada para a outra (**Figura 11-17a**) ocorre muito lentamente ou nem ocorre na maioria das membranas, embora a difusão lateral *no plano* da bicamada seja muito rápida (Figura 11-17b). O movimento transbicamada requer que um grupo polar ou carregado deixe seu meio aquoso e mova-se para o interior hidrofóbico da bicamada, processo com grande variação de energia livre positiva. Há, entretanto, situações em que tal movimento é essencial. Por exemplo, no retículo endoplasmático (RE), glicerofosfolipídeos de membrana são sintetizados na superfície citosólica, enquanto esfingolipídeos são sintetizados ou modificados na superfície luminal. Para saírem de seu local de síntese e atingirem seu ponto de deposição final, esses lipídeos devem passar por uma difusão de ponta-cabeça.

A disposição assimétrica de tipos lipídicos na bicamada prevê a existência de flipases, flopases e flip-flopases (Figura 11-17c), que facilitam o movimento de lipídeos transbicamada, provendo um caminho que é energeticamente mais favorável e muito mais rápido do que o movimento não catalisado. A combinação de biossíntese assimétrica dos lipídeos de membrana, difusão flip-flop não catalisada muito lenta e presença de trasladadores lipídicos dependentes de energia pode ser responsável pela assimetria transbicamada na composição lipídica mostrada na Figura 11-5. Além de contribuir na assimetria da composição, o transporte de lipídeos dependente de energia para uma lâmina da bicamada pode, pela criação de uma superfície maior em um lado da bicamada, ser importante na geração da curvatura da membrana essencial para o brotamento de vesículas.

As **flipases** catalisam o traslado dos *amino*fosfolipídeos fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina da lâmina extracelular para a citosólica, contribuindo para a distribuição

**(a) Difusão não catalisada transbicamada ("*flip-flop*")**

**(b) Difusão não catalisada lateral**

**(c) Traslado transbicamada catalisado**

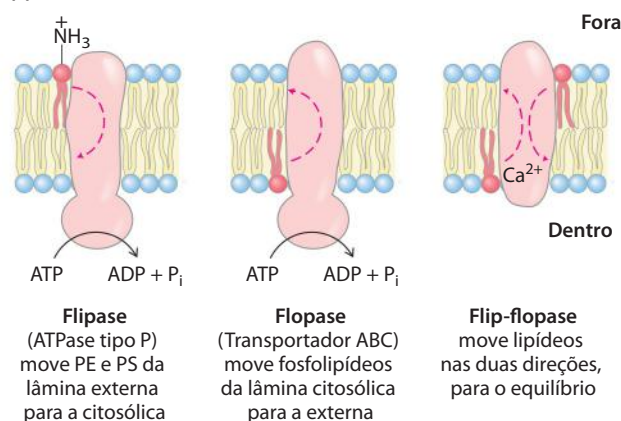



**FIGURA 11-17 Movimento de fosfolipídeos isolados na bicamada. (a)** O movimento não catalisado de uma lâmina para a outra é muito lento, mas **(b)** a difusão lateral na lâmina é muito rápida, sem precisar de catálise. **(c)** Três tipos de trasladadores de fosfolipídeos na membrana plasmática. PE é a fosfatidiletanolamina; PS é a fosfatidilserina.

assimétrica de fosfolipídeos: fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina principalmente na lâmina citosólica, e esfingolipídeos e fosfatidilcolina na lâmina externa. Manter a fosfatidilserina na lâmina extracelular é importante: sua exposição na superfície celular externa desencadeia apoptose (morte celular programada; ver Capítulo 12) e engolfamento por macrófagos com receptores para fosfatidilserina. Flipases também agem no RE, onde elas movem fosfolipídeos recém-sintetizados do seu local de síntese na lâmina citosólica para a lâmina luminal. As flipases consomem aproximadamente um ATP por molécula de fosfolipídeo trasladada, sendo estrutural e funcionalmente relacionadas às ATPases do tipo P (transportadores ativos) descritas na página 410.

Dois outros tipos de atividades de translocação de lipídeos são conhecidas, mas menos bem caracterizadas. As **flopases** movimentam fosfolipídeos da membrana plasmática da lâmina citosólica para a extracelular e, assim como as flipases, são dependentes de ATP. As flopases são membros da família de transportadores ABC descrita na página 413, em que todos transportam ativamente substratos hidrofóbicos para fora através da membrana plasmática. As **flip-flopases** são proteínas que movem qualquer fosfolipídeo da membrana através da bicamada a favor do gradiente de concentração (da lâmina com maior concentração para a lâmina com menor concentração); sua atividade não depende de ATP. A atividade da flip-flopase leva a uma distribuição aleatória controlada da composição dos grupos polares nas duas faces da bicamada. A atividade aumenta muito com o aumento da concentração do $Ca^{2+}$ citosólico, que pode resultar de ativação celular, dano celular, ou apoptose; como comentado anteriormente, a exposição da fosfatidilserina na superfície externa sinaliza a célula para apoptose e engolfamento por macrófagos. Finalmente, acredita-se que um grupo de proteínas que age principalmente na movimentação de fosfatidilinositóis através das bicamadas lipídicas, as proteínas de transferência do fosfatidilinositol, tenha um importante papel na sinalização lipídica e no tráfego de membrana.

## Lipídeos e proteínas difundem-se lateralmente na bicamada

Moléculas lipídicas individuais podem mover-se lateralmente no plano da membrana trocando de lugar com suas moléculas lipídicas vizinhas. Isto é, elas possuem movimento browniano dentro da bicamada (Figura 11-17b), que pode ser muito rápido. Uma molécula na lâmina externa da membrana plasmática de eritrócito, por exemplo, pode difundir-se lateralmente de forma tão rápida que ela circunavega o eritrócito em segundos. Essa difusão lateral rápida no plano da bicamada tende a tornar aleatórias as posições das moléculas individuais em poucos segundos.

A difusão lateral pode ser mostrada experimentalmente ao se anexar sondas fluorescentes aos grupos polares dos lipídeos e usando microscopia de fluorescência para acompanhar as sondas no decorrer do tempo (**Figura 11-18**). Em uma das técnicas, uma pequena região (5 $\mu m^2$) de uma superfície celular com lipídeos marcados por fluorescência é descorada por uma intensa radiação, de forma que o pe-

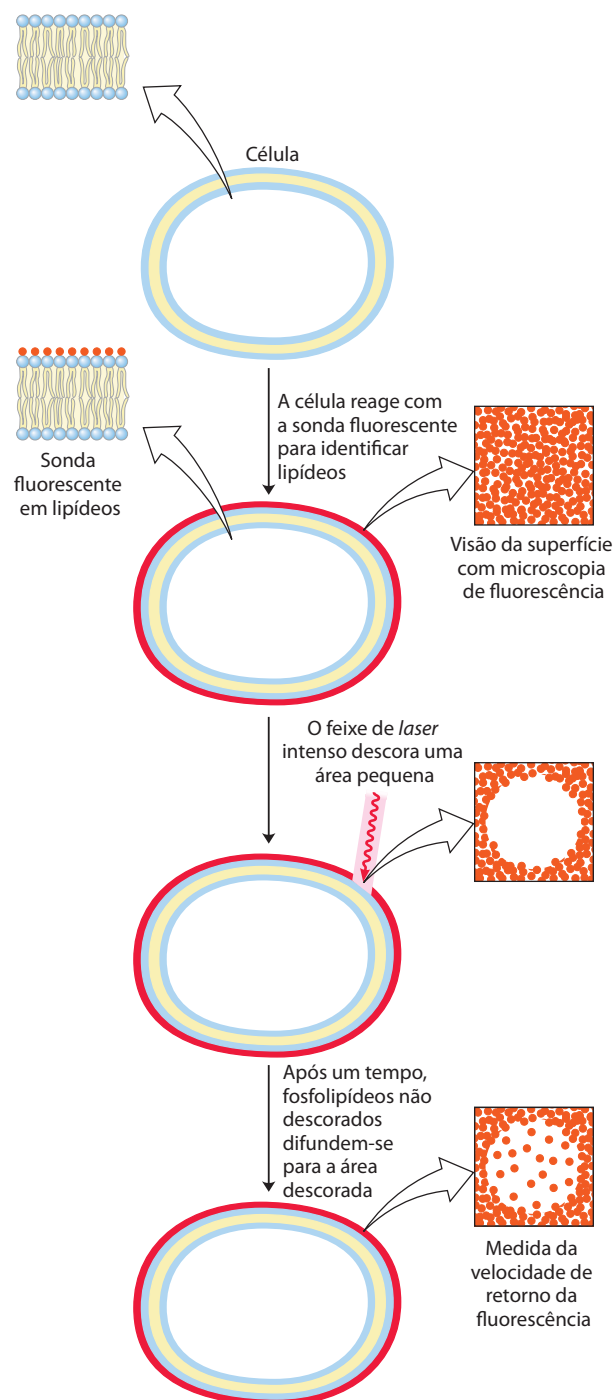



**FIGURA 11-18 Medida da velocidade de difusão lateral de lipídeos pela recuperação da fluorescência após fotodescoloração (FRAP).** Os lipídeos na lâmina externa da membrana plasmática são marcados pela reação com uma sonda impermeante à membrana (em vermelho), de modo que a superfície é identificada uniformemente quando vista sob um microscópio de fluorescência. Uma área pequena é descorada pela irradiação com um feixe de *laser* intenso e torna-se não fluorescente. Com o passar do tempo, moléculas lipídicas marcadas difundem-se para a região descorada, que se torna então novamente fluorescente. Os pesquisadores podem acompanhar o curso temporal do retorno da fluorescência e determinar um coeficiente de difusão para o lipídeo marcado. As velocidades de difusão são geralmente altas; um lipídeo que se move com essa velocidade poderia circunavegar uma célula de *E. coli* em um segundo. (O método FRAP também pode ser usado para medir a difusão lateral de proteínas de membrana.)

daço irradiado não fluoresça mais quando visto com uma luz menos intensa no microscópio de fluorescência. Entretanto, dentro de milissegundos, a região recupera sua fluorescência na medida em que moléculas lipídicas não descoradas difundem-se para a parte descorada e as moléculas lipídicas descoradas difundem-se e afastam-se dali. A velocidade de recuperação da fluorescência após a *f*otodescoloração, ou **FRAP** (de *fluorescence recovery after photobleaching*), é uma medida da velocidade de difusão lateral dos lipídeos. Usando a técnica de FRAP, pesquisadores mostraram que alguns lipídeos de membrana difundem-se lateralmente em velocidades de até 1 $\mu$m/s.

Outra técnica, o rastreamento de partícula única, permite acompanhar o movimento de uma *única* molécula lipídica na membrana plasmática em uma escala de tempo muito menor. Resultados desses estudos confirmam uma difusão lateral rápida em pequenas regiões não conectadas da superfície celular e mostram que o movimento dessa região para uma região próxima (difusão por "salto") é inibido; lipídeos de membrana comportam-se como se estivessem encurralados por cercas, que eles podem ocasionalmente atravessar por difusão (**Figura 11-19**).

Muitas proteínas de membrana movem-se como se flutuassem em um mar de lipídeos. Assim como os lipídeos de membrana, essas proteínas estão livres para se difundirem lateralmente no plano da bicamada e estão em constante movimento, como mostrado pela técnica de FRAP em proteínas de superfície identificadas por fluorescência. Algumas proteínas de membrana se associam e formam grandes agregados (regiões) na superfície da célula ou da organela, nos quais moléculas proteicas não se movem em relação umas às outras; por exemplo, receptores de acetilcolina formam regiões densas, quase cristalinas nas membranas plasmáticas neuronais em sinapses. Outras proteínas de membrana são ancoradas às estruturas internas para impedir sua difusão livre. Na membrana de eritrócito, tanto a glicoforina quanto o trocador cloreto-bicarbonato (p. 407) são ligados à espectrina, uma proteína filamentosa do citoesqueleto (**Figura 11-20**). Uma possível explicação para o padrão de difusão lateral das moléculas lipídicas mostrado na Figura 11-19 é que as proteínas de membrana imobilizadas pelas suas associações com a espectrina formam "cercas" que definem as regiões de movimento lipídico relativamente irrestrito.

**FIGURA 11-20 Movimento restrito do trocador de cloreto-bicarbonato e da glicoforina do eritrócito.** As proteínas atravessam a membrana e são amarradas à espectrina, uma proteína do citoesqueleto, por outra proteína, a anquirina, limitando sua mobilidade lateral. A anquirina está ancorada na membrana por uma cadeia lateral pamitoil, ligada covalentemente à proteína (ver Figura 11-15). A espectrina, uma proteína filamentosa longa, é unida por ligação cruzada a complexos juncionais contendo actina. Uma rede de moléculas de espectrina, em ligação cruzada, associada à face citosplasmática da membrana plasmática, estabiliza a membrana, tornando-a resistente à deformação. Essa rede de proteínas de membrana ancoradas pode formar o "curral" sugerido no experimento mostrado na Figura 11-19; as trajetórias lipídicas mostradas aqui estão confinadas a diferentes regiões definidas pelas proteínas de membrana amarradas. Ocasionalmente, a molécula lipídica (trajetória verde) salta de um curral para outro (trajetória azul) e depois para outro (trajetória vermelha).

**FIGURA 11-19 Difusão de moléculas lipídicas individuais.** O movimento em uma superfície celular de uma única molécula lipídica marcada com fluorescência é registrado em vídeo por microscopia de fluorescência, com uma resolução temporal de 25 $\mu$s (equivalente a 40.000 quadros/s). A trajetória mostrada aqui representa uma molécula acompanhada durante 56 ms (2.250 quadros); a trilha inicia na área roxa e continua pela azul, verde e cor de laranja. O padrão de movimento indica uma difusão rápida em uma região confinada (com aproximadamente 250 nm de diâmetro, mostrado em uma única cor), com saltos ocasionais para uma região adjacente. Essa observação sugere que os lipídeos estejam encurralados por cercas moleculares, que eles podem pular ocasionalmente.

## Esfingolipídeos e colesterol agrupam-se em balsas de membrana

Foi constatado que a difusão de lipídeos de membrana de uma lâmina da bicamada para a outra é muito lenta, a menos que seja catalisada, e que diferentes espécies lipídicas da membrana plasmática são assimetricamente distribuídas nas duas lâminas da bicamada (Figura 11-5). Mesmo em uma única lâmina da membrana, a distribuição lipídica não é uniforme. Os glicoesfingolipídeos (cerebrosídeos e gangliosídeos), que geralmente contêm cadeias longas de ácidos graxos saturados, formam agregados transitórios na lâmina externa que excluem glicerofosfolipídeos, que, por sua vez, normalmente contêm um grupo acil graxo insaturado e um grupo acil saturado menor. Os grupos acil saturados longos de esfingolipídeos podem formar associações mais estáveis e compactas com o sistema de anéis longo do colesterol do que as cadeias mais curtas e geralmente insaturadas de fosfolipídeos. Os **microdomínios** colesterol-

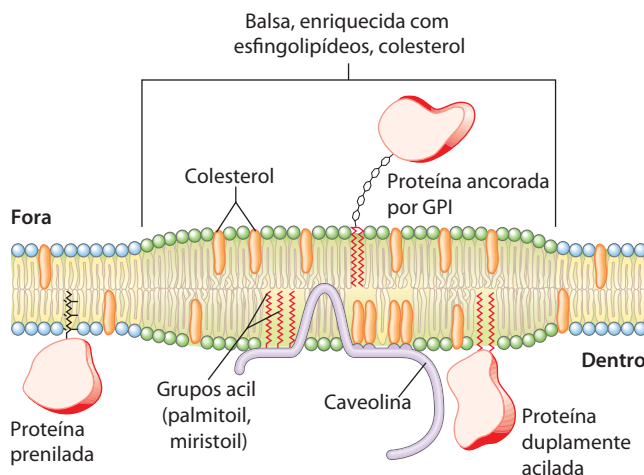



**FIGURA 11-21 Microdomínios na membrana (balsas).** Associações estáveis de esfingolipídeos e colesterol na lâmina externa produzem um microdomínio, levemente mais espesso do que em outras regiões da membrana, que é enriquecido com tipos específicos de proteínas de membrana. Proteínas ancoradas por GPI são salientes na lâmina externa dessas balsas, e proteínas com um ou vários desses grupos acil de cadeia longa ligados covalentemente são comuns na lâmina interna. Balsas curvadas para dentro, chamadas cavéolas, são especialmente enriquecidas com a proteína caveolina (ver Figura 11-22). Proteínas ligadas com o grupo prenil (como a Ras; ver Quadro 12-2) tendem a ser excluídas das balsas.

-esfingolipídeos na monocamada externa da membrana plasmática são levemente mais espessos e mais ordenados (menos fluidos) do que os microdomínios vizinhos ricos em fosfolipídeos, sendo mais difíceis de serem dissolvidos com detergentes não iônicos; eles comportam-se como **balsas** de esfingolipídeos líquidos ordenados à deriva em um oceano de fosfolipídeos líquidos desordenados (**Figura 11-21**).

Essas balsas lipídicas são notavelmente enriquecidas em duas classes de proteínas integrais de membrana: aquelas ancoradas à membrana por duas cadeias longas de ácidos graxos saturados ligados covalentemente por resíduos de Cys (dois grupos palmitoil ou um grupo palmitoil e um grupo miristoil) e **proteínas ancoradas por GPI** (Figura 11-15). Presumivelmente, essas âncoras lipídicas, assim como as cadeias acil longas e saturadas dos esfingolipídeos, formam associações mais estáveis com o colesterol e com os longos grupos acil em balsas do que com os fosfolipídeos vizinhos. (É notável que outras proteínas ligadas a lipídeos, aquelas com grupos isoprenil ligados covalentemente, como o farnesil, *não* estejam preferencialmente associadas com a lâmina externa das balsas de esfingolipídeos/colesterol [Figura 11-21].) Os domínios "balsa" e "mar" da membrana plasmática não são rigidamente separados; as proteínas de membrana podem mover-se para dentro e para fora das balsas lipídicas em uma escala de tempo de segundos. Contudo, em uma escala de tempo menor (microssegundos), mais relevante para muitos processos bioquímicos mediados pela membrana, muitas dessas proteínas residem principalmente em uma balsa.

É possível estimar a fração da superfície celular ocupada por balsas pela fração da membrana plasmática que resiste à solubilização por detergente, fração que pode alcançar até 50% em alguns casos: as balsas cobrem metade do oceano. Medidas indiretas em fibroblastos em cultura sugerem um diâmetro aproximado de 50 nm para uma balsa individual, que corresponde a uma região contendo alguns milhares de esfingolipídeos e talvez 10 a 50 proteínas de membrana. Como a maioria das células expressa mais do que 50 tipos diferentes de proteínas plasmáticas, é provável que uma única balsa contenha apenas um subconjunto de proteínas de membrana e que essa segregação de proteínas de membrana seja significativa do ponto de vista funcional. Para um processo que envolve a interação de duas proteínas de membrana, a presença delas em uma única balsa aumentaria muito a probabilidade de colisão. Alguns receptores de membrana e proteínas de sinalização, por exemplo, parecem estar juntos em balsas de membrana. Experimentos mostram que a sinalização por essas proteínas pode ser interrompida por manipulações que removem o colesterol da membrana plasmática e destroem as balsas lipídicas.

A **caveolina** é uma proteína integral de membrana com dois domínios globulares conectados por um domínio hidrofóbico em forma de grampo de cabelo, que liga a proteína à lâmina citoplasmática da membrana plasmática. Três grupos palmitoil ligados ao domínio globular carboxiterminal posteriormente ancoram-na à membrana. A caveolina (na realidade, uma família de caveolinas relacionadas) forma dímeros e associa-se a regiões enriquecidas com colesterol na membrana, e a presença de dímeros de caveolina força a bicamada lipídica associada a se curvar para dentro, formando **cavéolas** ("pequenas cavernas") na superfície da célula (**Figura 11-22**). As cavéolas são balsas incomuns: elas envolvem as *duas* lâminas da bicamada – a lâmina citoplasmática, a partir da qual o domínio globular da caveolina se projeta, e a lâmina extracelular, uma balsa de esfingolipídeo/colesterol típica associada com proteínas ancoradas por GPI. As cavéolas estão envolvidas com várias funções celulares, incluindo o tráfego de membrana no interior celular e a transdução de sinais externos em respostas celulares. Os receptores para a insulina e outros fatores de crescimento, assim como certas proteínas ligadas ao GPI, e proteínas-cinases associadas à sinalização transmembrana, parecem estar localizados em balsas e talvez em cavéolas. Serão discutidos alguns possíveis papéis das balsas em sinalização no Capítulo 12.

## A curvatura da membrana e a fusão são fundamentais para muitos processos biológicos

A caveolina não é única em sua capacidade de induzir curvatura em membranas. Mudanças de curvatura são fundamentais para uma das mais notáveis características das membranas biológicas: a capacidade de se fundir com outras membranas sem perder suas continuidades. Embora as membranas sejam estáveis, elas não são estáticas. Dentro do sistema de endomembranas eucarióticas (que inclui a membrana nuclear, o retículo endoplasmático, o aparelho de Golgi e várias vesículas pequenas), os compartimentos membranosos se reorganizam constantemente. Vesículas brotam do RE para carregar lipídeos e proteínas recém-sintetizados para organelas e para a membrana plasmática. Exocitose, endocitose, divisão celular, fusão do óvulo com espermatozoide e entrada de vírus envolto por membrana na sua célula hospedeira envolvem a reorganização de membrana, na qual a operação fundamental é a fusão de dois segmentos de membrana sem perda de continuidade (**Figura 11-23**). A maioria desses processos começa com um aumento local

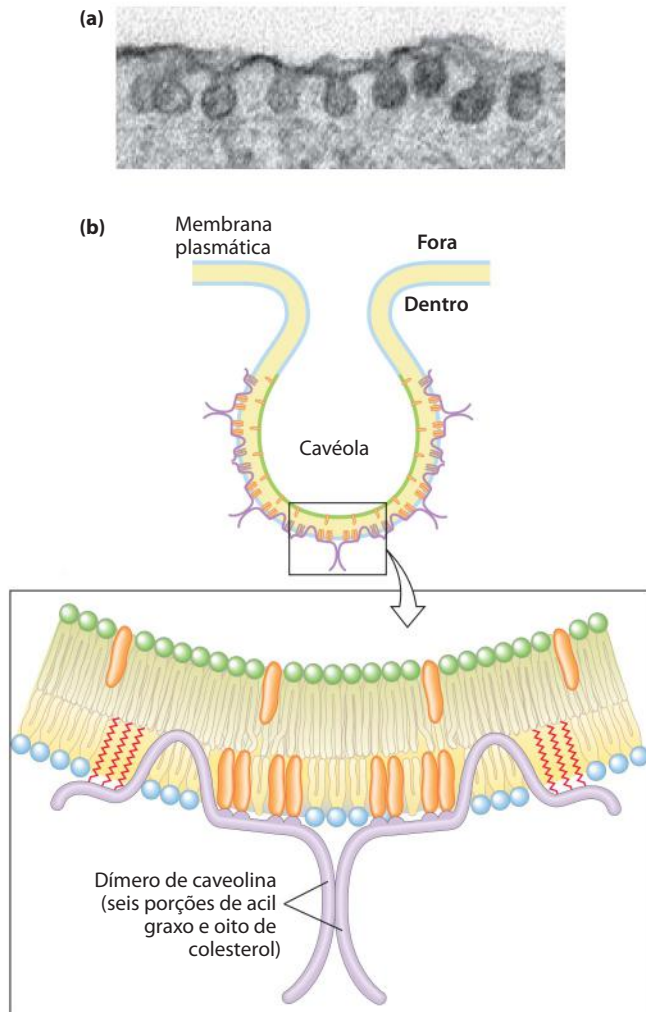



**FIGURA 11-22 A caveolina força a curvatura da membrana para dentro.** Cavéolas são pequenas invaginações na membrana plasmática, como aparece em **(a)** uma micrografia eletrônica de um adipócito identificado na superfície com um marcador eletrodenso. **(b)** Desenho mostrando a localização e o papel da caveolina em causar a curvatura da membrana para dentro. Cada monômero de caveolina possui um domínio hidrofóbico central e três grupos acil de cadeia longa (em vermelho), que seguram a molécula no interior da membrana plasmática. Quando vários dímeros de caveolina são concentrados em uma pequena região (uma balsa), eles forçam a curvatura na bicamada lipídica, formando a cavéola. Moléculas de colesterol na bicamada são mostradas em cor de laranja.

**FIGURA 11-23 Fusão de membrana.** A fusão de duas membranas é fundamental em uma grande variedade de processos celulares envolvendo organelas e a membrana plasmática.

na curvatura da membrana. Uma proteína que é intrinsecamente curva pode forçar a curvatura da bicamada ao ligar-se nela (**Figura 11-24**); a energia de ligação provê uma força impulsora para aumentar a curvatura da bicamada. De forma alternativa, múltiplas subunidades de uma proteína de suporte podem ser montadas em complexos supramoleculares curvos e estabilizar curvas que espontaneamente se formam na bicamada. Por exemplo, uma superfamília de proteínas contendo **domínios BAR** (que ganharam esse nome devido aos três primeiros membros da família a serem identificados: *B*IN1, *a*nfifisina e *R*VS167) podem agrupar-se de forma crescente adquirindo o formato de um andaime, que se liga à superfície da membrana, forçando ou favorecendo a curvatura da membrana. Domínios BAR consistem em espirais enroladas que formam dímeros curvos longos e finos com uma superfície côncava carregada positivamente que tende a formar interações iônicas com os grupos polares carregados negativamente das cabeças dos fosfolipídeos de membrana (Figura 11-24). Algumas dessas proteínas BAR também têm uma região helicoidal que se insere em uma lâmina da bicamada, expandindo sua área em relação à outra lâmina, forçando a curvatura.

A fusão específica de duas membranas requer que: (1) elas se reconheçam mutuamente; (2) as suas superfícies tornem-se justapostas, o que requer a remoção de moléculas de água normalmente associadas aos grupos polares das cabeças dos lipídeos; (3) as estruturas das suas bicamadas sejam localmente rompidas, resultando em fusão da lâmina externa de cada membrana (hemifusão); e (4) suas bicamadas fundam-se para formar uma bicamada contínua única. A fusão que ocorre na endocitose mediada por receptor, ou secreção regulada, também requer que (5) o processo seja desencadeado em tempo adequado ou em resposta a um sinal específico. Proteínas integrais chamadas de **proteínas de fusão** medeiam esses eventos, proporcionando reconhecimento específico e uma distorção local transitória da estrutura da bicamada que favorece a fusão de membrana. (Observe que essas proteínas de fusão não têm relação com os produtos codificados por dois genes fusionados, também chamados de proteínas de fusão, discutidos no Capítulo 9.)

Um exemplo bem estudado de fusão de membrana é o que ocorre nas sinapses, quando vesículas intracelula-

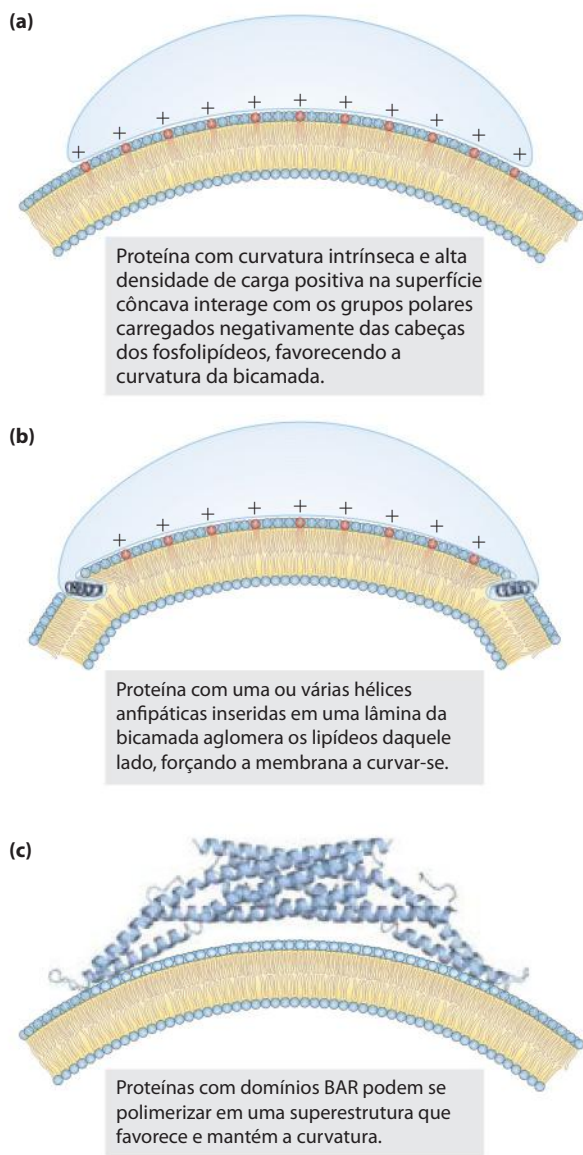



**FIGURA 11-24 Três modelos de curvatura de membrana induzida por proteína.**

res carregadas com neurotransmissores se fundem com a membrana plasmática. Esse processo envolve uma família de proteínas chamadas de SNARE (receptores de SNAP, de *SNAP Receptors*) (**Figura 11-25**). As SNARE da face citoplasmática das vesículas são chamadas de **v-SNARE**; aquelas da membrana-alvo com a qual a vesícula se funde (a membrana plasmática, durante a exocitose) são as **t-SNARE**. Duas outras proteínas, a proteína de fusão sensível a *N*-etilmaleimida (NSF, de *NEM-sensitive fusion*) e a proteína de ligação a NSF solúvel 25 (SNAP25, de *Soluble NSF Attachment protein 25*), também estão envolvidas. Durante a fusão, a v-SNARE e a t-SNARE se ligam uma à outra e sofrem uma mudança estrutural que produz um feixe de bastonetes longos e finos feitos de hélices de ambas as SNARE e de duas hélices de SNAP25 (Figura 11-25). As duas SNARE inicialmente interagem em suas extremidades, e então fecham em zíper em um feixe de hélices. Essa

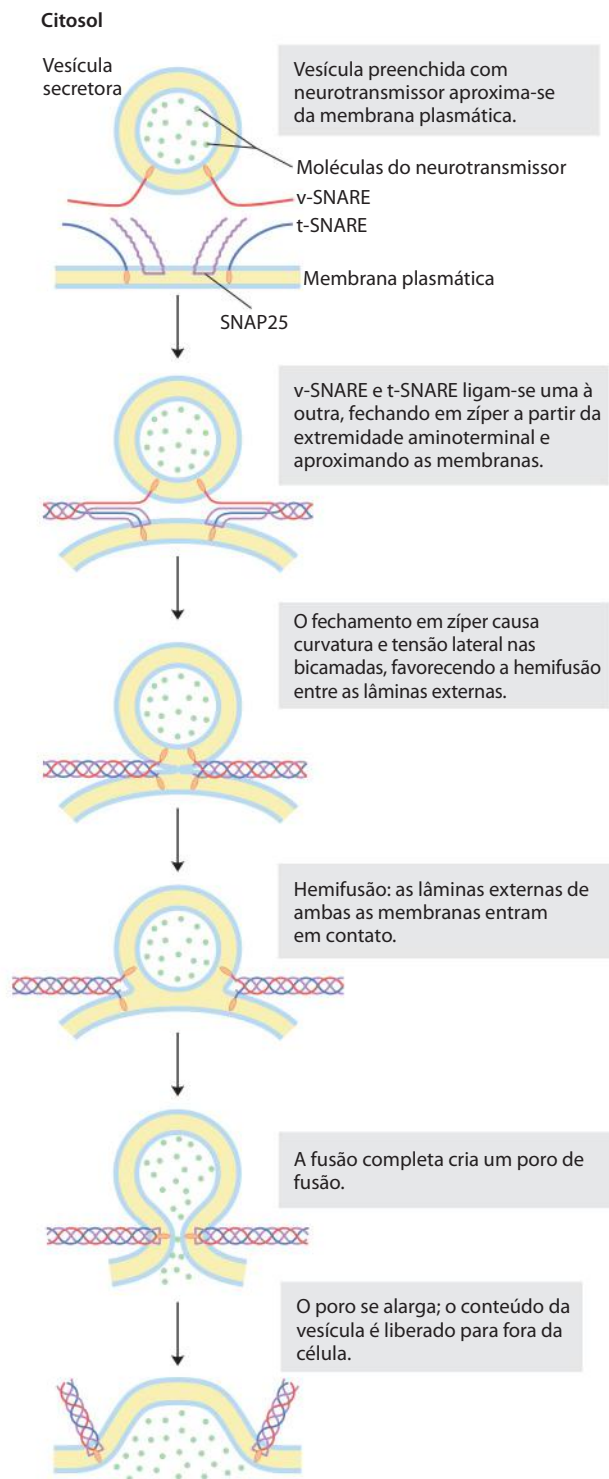



**FIGURA 11-25 Fusão da membrana durante a liberação de neurotransmissor na sinapse.** A membrana da vesícula secretora contém a sinaptobrevina v-SNARE (em vermelho). A membrana-alvo (plasmática) contém a sintaxina t-SNARE (em azul) e SNAP25 (em roxo). Quando um aumento local de [$Ca^{2+}$] sinaliza liberação do neurotransmissor, v-SNARE, SNAP25 e t-SNARE interagem, formando um feixe enrolado de quatro hélices $\alpha$, aproximando as duas membranas e rompendo localmente a bicamada. Isso leva primeiro à hemifusão, unindo as monocamadas externas das duas membranas, para então completar a fusão da membrana e liberar o neurotransmissor. O NSF (fator *N*-etilmaleimida sensível à *fusão*) atua na desmontagem do complexo SNARE quando a fusão é completa.

mudança estrutural faz as duas membranas entrarem em contato e inicia a fusão de suas bicamadas lipídicas.

O complexo de SNARE e SNAP25 é o alvo da poderosa toxina *Clostridium botulinum*, protease que cliva ligações específicas nessas proteínas, impedindo a neurotransmissão e causando a morte do organismo. Devido à sua alta especificidade para essas proteínas, a toxina botulínica purificada tem servido como poderosa ferramenta para o detalhamento do mecanismo de liberação de neurotransmissor *in vivo* e *in vitro*.

### Proteínas integrais da membrana plasmática estão envolvidas na adesão de superfície, na sinalização e em outros processos celulares

Várias famílias de proteínas integrais na membrana plasmática proveem pontos específicos de ligação entre células, ou entre a célula e as proteínas da matriz extracelular. As **integrinas** são proteínas de adesão à superfície que controlam a interação da célula com a matriz extracelular e com outras células, incluindo alguns patógenos. Integrinas também carregam sinais em ambos os sentidos através da membrana plasmática, integrando informação sobre os meios extra e intracelular. Todas as integrinas são proteínas heterodiméricas compostas por duas subunidades distintas, $\alpha$ e $\beta$, cada uma ancorada à membrana plasmática por uma única hélice transmembrana. Os grandes domínios extracelulares das subunidades $\alpha$ e $\beta$ combinam-se para formar um sítio de ligação específico para proteínas extracelulares, como o colágeno e a fibronectina, que contêm um determinante comum de ligação à integrina, a sequência Arg-Gly-Asp (RGD). As funções de sinalização das integrinas serão discutidas em mais detalhes no Capítulo 12 (p. 470).

Outras proteínas da membrana plasmática envolvidas na adesão à superfície são as **caderinas**, que sofrem interações homofílicas ("do mesmo tipo") com caderinas idênticas em uma célula adjacente. As **selectinas** têm domínios extracelulares que, na presença de $Ca^{2+}$, ligam polissacarídeos específicos à superfície de uma célula adjacente. As selectinas estão presentes principalmente em vários tipos de células sanguíneas e nas células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos (ver Figura 7-32). Elas são parte essencial do processo de coagulação sanguínea.

Proteínas integrais de membrana participam em muitos outros processos celulares. Servem de transportadores e canais iônicos (discutido na Seção 11.3) e de receptores para hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento (Capítulo 12). São fundamentais para a fosforilação oxidativa e a fotofosforilação (Capítulo 19), assim como o reconhecimento célula-célula e célula-antígeno no sistema imune (Capítulo 5). Proteínas integrais têm papéis importantes na fusão de membranas que acompanha a exocitose, a endocitose e a entrada de muitos tipos de vírus nas células hospedeiras.

### RESUMO 11.2 Dinâmica da membrana

- Os lipídeos das membranas biológicas podem existir em estados líquido ordenado ou líquido desordenado; neste último caso, o movimento térmico das cadeias acil torna o interior da bicamada fluido. A fluidez é afetada pela temperatura, composição de ácidos graxos e conteúdo de esteroides.
- A difusão de ponta-cabeça (*flip-flop*) de lipídeos entre as lâminas interna e externa da membrana é muito lenta, exceto quando especificamente catalisada por flipases, flopases ou flip-flopases.
- Os lipídeos e as proteínas podem difundir-se lateralmente no plano da membrana, mas essa mobilidade é limitada por interações das proteínas de membrana com estruturas do citoesqueleto e interações dos lipídeos com balsas lipídicas. Uma classe de balsas lipídicas consiste em esfingolipídeos e colesterol com um conjunto de proteínas de membrana ligadas ao GPI ou a várias porções de acil graxos de cadeia longa.
- A caveolina é uma proteína integral de membrana que se associa com a lâmina interna da membrana plasmática, forçando-a a curvar-se para dentro e formar uma cavéola, provavelmente envolvida com transporte de membrana e sinalização.
- Proteínas específicas contendo domínios BAR causam curvaturas locais na membrana e controlam a fusão de duas membranas, que acompanha processos como a endocitose, a exocitose e a invasão viral.
- As integrinas são proteínas transmembrana da membrana plasmática que agem tanto para ligar as células entre si, quanto para conduzir mensagens entre a matriz extracelular e o citoplasma.

## 11.3 Transporte de solutos através da membrana

Toda célula viva deve obter materiais brutos de seu ambiente para a biossíntese e a produção de energia, devendo liberar os produtos de seu metabolismo para o meio. Alguns compostos apolares podem dissolver-se na bicamada lipídica e atravessar a membrana sem auxílio, mas, para o movimento transmembrana de qualquer composto polar ou íon, uma proteína de membrana é essencial. Em alguns casos, a proteína de membrana simplesmente facilita a difusão do soluto a favor de seu gradiente de concentração, mas o transporte também pode ocorrer contra um gradiente de concentração, de carga elétrica, ou ambos, e nesse caso o processo requer energia (**Figura 11-26**). A energia pode vir diretamente da hidrólise de ATP ou pode ser suprida na forma de um soluto movendo-se a favor de seu gradiente eletroquímico, que provê energia suficiente para conduzir outro soluto contra o seu gradiente. Os íons também podem se mover através da membrana via canais iônicos formados por proteínas, ou eles podem ser transportados por ionóforos, moléculas pequenas que mascaram a carga dos íons e os permitem difundir através da bicamada lipídica. Com poucas exceções, o tráfego de pequenas moléculas através da membrana plasmática é mediado por proteínas como canais transmembrana, carreadores ou bombas. Dentro da célula eucariótica, diferentes compartimentos têm diferentes concentrações de íons e de intermediários e produtos metabólicos, que também devem atravessar membranas intracelulares em processos mediados por proteínas e altamente regulados.

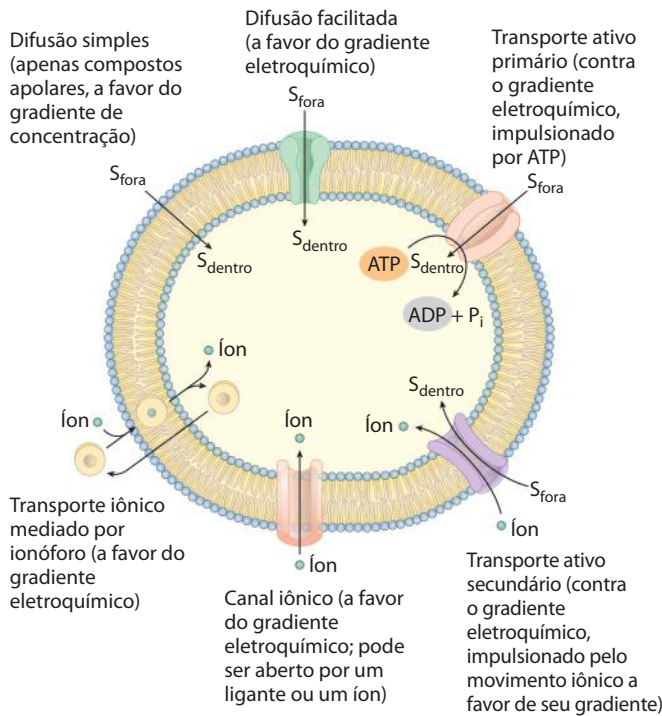



**FIGURA 11-26 Resumo dos tipos de transportadores.** Alguns tipos (ionóforos, canais iônicos e transportadores passivos) simplesmente aceleram o movimento do soluto através da membrana a favor de seu gradiente eletroquímico, enquanto outros (transportadores ativos) podem bombear solutos contra o gradiente, usando o ATP ou o gradiente de um soluto secundário para prover energia.

## O transporte passivo é facilitado por proteínas de membrana

Quando dois compartimentos aquosos contendo concentrações desiguais de um composto solúvel ou íon são separados por uma divisória permeável (membrana), o soluto se move por **difusão simples** da região de maior concentração, através da membrana, para a região de menor concentração, até que os dois compartimentos tenham concentrações iguais de soluto (**Figura 11-27a**). Quando íons de cargas opostas são separados por uma membrana permeável, existe um gradiente elétrico transmembrana, um **potencial de membrana, $V_m$** (expresso em milivolts). Esse potencial de membrana produz uma força que se opõe ao movimento de íons, que aumenta o $V_m$, e que impulsiona o movimento de íons, que reduz o $V_m$ (Figura 11-27b). Assim, a direção na qual solutos carregados tendem a se mover espontaneamente através da membrana depende tanto do gradiente químico (a diferença na concentração de soluto) quanto do gradiente elétrico ($V_m$) através da membrana. Juntos, esses dois fatores são chamados de **gradiente eletroquímico** ou **potencial eletroquímico**. Esse comportamento de solutos está de acordo com a segunda lei da termodinâmica: moléculas tendem a assumir espontaneamente a distribuição de maior aleatoriedade e mais baixa energia.

Para atravessar a bicamada lipídica, um soluto polar ou carregado deve primeiro abandonar as interações com as moléculas de água da sua camada de hidratação, e então difundir-se por cerca de 3 nm (30 Å) por uma substância (lipídeo) em que é muito pouco solúvel (**Figura 11-28**). A energia usada para livrar-se da camada de hidratação e para mover o composto polar da água para o lipídeo, e depois através da bicamada lipídica, é recuperada à medida que o composto deixa a membrana do outro lado e é reidratado. Entretanto, o estágio intermediário da passagem transmembrana é um estado de alta energia comparável ao estado de transição em uma reação química catalisada por enzima. Em ambos os casos, uma barreira de ativação deve ser superada para alcançar o estágio intermediário (Figura 11-28; compare com a Figura 6-3). A energia de ativação ($\Delta G^{\ddagger}$) para o traslado de um soluto polar através da bicamada é tão grande que bicamadas lipídicas puras são praticamente impermeáveis a espécies polares e carregadas no período relevante para o crescimento e a divisão celular.

Proteínas de membrana reduzem a energia de ativação para o transporte de compostos polares e íons ao prover um caminho alternativo para solutos específicos através da membrana. Proteínas que promovem essa **difusão facili-**

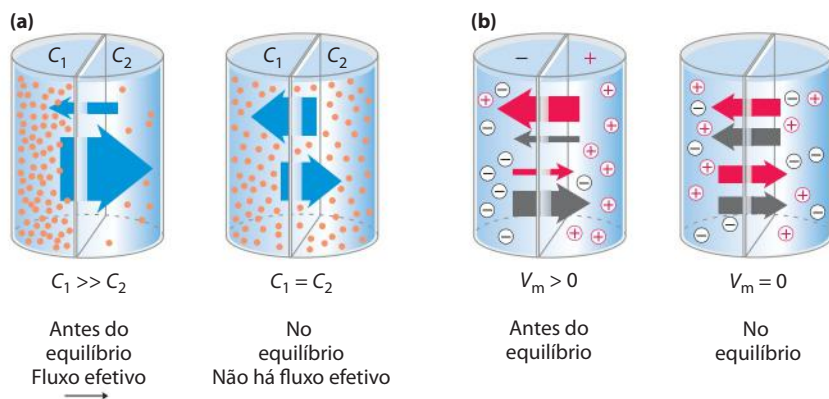



**FIGURA 11-27 Movimento de solutos através de uma membrana permeável.** **(a)** O movimento efetivo de um soluto eletricamente neutro é dirigido para o lado de menor concentração de soluto até o equilíbrio ser alcançado. As concentrações de soluto nos lados esquerdo e direito da membrana são designadas por $C_1$ e $C_2$. A taxa de movimento de solutos transmembrana (indicada pelas setas) é proporcional à razão entre as concentrações. **(b)** O movimento efetivo de um soluto carregado eletricamente é determinado pela combinação do potencial elétrico ($V_m$) e pela razão entre as concentrações químicas ($C_2/C_1$) através da membrana; o movimento iônico resultante continua até o potencial eletroquímico chegar a zero.

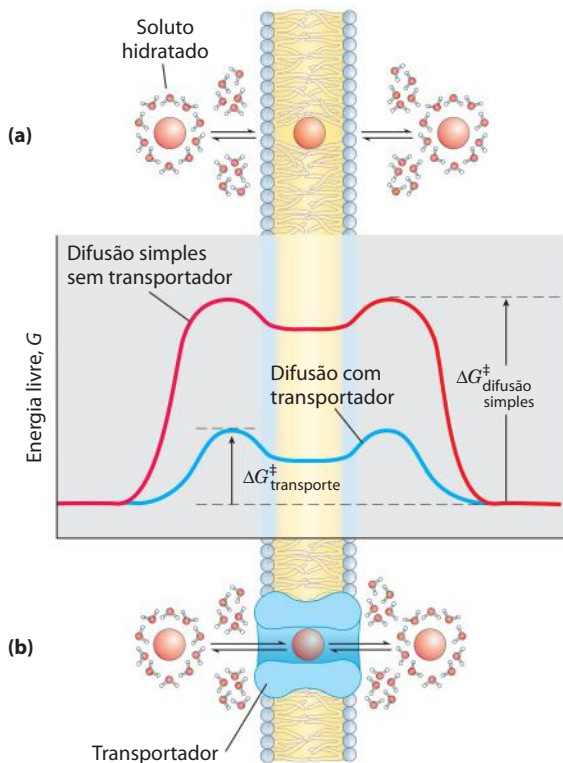



**FIGURA 11-28 Variação de energia que acompanha a passagem de um soluto hidrofílico através da bicamada lipídica de uma membrana biológica.** **(a)** Na difusão simples, a remoção da camada de hidratação é altamente endergônica, e a energia de ativação ($\Delta G^{\ddagger}$) para difusão através da bicamada é muito alta. **(b)** Uma proteína transportadora reduz o $\Delta G^{\ddagger}$ para a difusão transmembrana do soluto. Isso ocorre pela formação de interações não covalentes com o soluto desidratado, pela substituição das ligações de hidrogênio com água e pelo estabelecimento de uma via hidrofílica transmembrana.

**tada**, ou **transporte passivo**, não são enzimas no sentido comum; os seus "substratos" são deslocados de um compartimento para outro, mas não são quimicamente alterados. Proteínas de membrana que aceleram o movimento do soluto através da membrana pela difusão facilitada são chamadas de **transportadores** ou **permeases**.

Assim como as enzimas, os transportadores ligam-se aos seus substratos com especificidade estereoquímica por meio de múltiplas interações fracas não covalentes. A variação de energia livre negativa associada a essas interações fracas, $\Delta G_{\text{ligação}}$, contrabalança a variação de energia livre positiva que acompanha a perda de água de hidratação do substrato, $\Delta G_{\text{desidratação}}$, diminuindo o $\Delta G^{\ddagger}$ para a passagem transmembrana (Figura 11-28). Os transportadores atravessam várias vezes a bicamada lipídica, formando uma via transmembrana revestida com cadeias laterais de aminoácidos hidrofílicos. As vias proporcionam uma rota alternativa para um substrato específico mover-se através da bicamada lipídica sem precisar dissolver-se na bicamada, reduzindo o $\Delta G^{\ddagger}$ para a difusão transmembrana. O resultado é um aumento de várias a muitas ordens de magnitude na velocidade de passagem transmembrana do substrato.

## Transportadores e canais iônicos são fundamentalmente diferentes

Sabe-se a partir de estudos genômicos que os transportadores constituem uma fração significativa entre todas as proteínas codificadas em genomas de organismos tanto simples quanto complexos. É provável que existam alguns milhares, ou mais, de diferentes genes no genoma humano codificando proteínas que permitem que moléculas e íons atravessem a membrana. Essas proteínas pertencem a duas categorias muito amplas: transportadores e canais (**Figura 11-29**). Os **transportadores** de moléculas e íons ligam seus substratos com uma especificidade muito alta, catalisam transporte a velocidades bem abaixo dos limites da difusão livre e são saturáveis no mesmo sentido que as enzimas: existe uma determinada concentração de substrato acima da qual um posterior aumento não aumentará a velocidade de transporte. Os **canais** em geral permitem movimento transmembrana de íons em velocidades com ordens de magnitude maiores do que aquela típica dos transportadores, velocidades que se aproximam ao limite da difusão livre (dezenas de milhões de íons por segundo por canal). Os canais mostram geralmente alguma especificidade para um íon, mas não são saturáveis pelo íon, ao contrário da cinética de saturação vista em transportadores. A direção do movimento do íon por um canal iônico é determinada

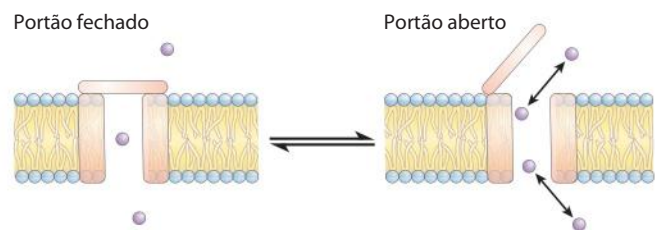
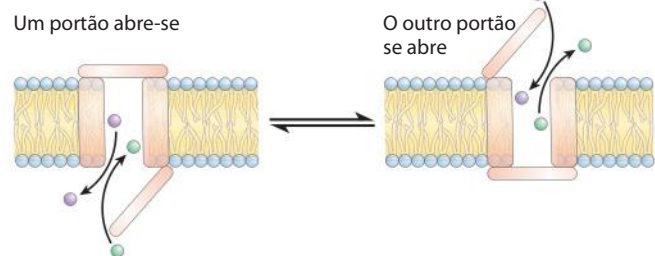



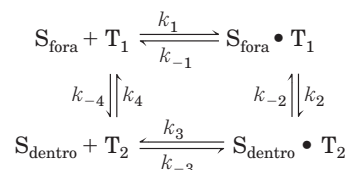
**FIGURA 11-29 Diferenças entre canais e transportadores.** **(a)** Em um canal iônico, um poro transmembrana está aberto ou fechado, dependendo da posição do único portão. Quando ele estiver aberto, íons passam através dele com uma velocidade limitada apenas pela taxa de difusão máxima do equilíbrio. **(b)** Transportadores (bombas) possuem dois portões, que nunca estão abertos ao mesmo tempo. O movimento de um substrato (um íon ou uma pequena molécula) através da membrana é portanto limitado pelo tempo necessário para um portão abrir e fechar (em um lado da membrana) e para o segundo portão abrir. A velocidade de movimento através dos canais iônicos pode ter ordens de magnitude acima da velocidade de movimento através das bombas, porém os canais permitem o fluxo dos íons apenas a favor de seus gradientes eletroquímicos, enquanto bombas podem mover substratos contra o seu gradiente de concentração.

pela carga do íon e pelo gradiente eletroquímico através da membrana. Dentro de cada uma dessas categorias estão as famílias de vários tipos, definidas não apenas pelas suas sequências primárias, mas pelas suas estruturas secundárias. Entre os transportadores, alguns simplesmente facilitam a difusão a favor do gradiente de concentração; eles são os **transportadores passivos**. **Transportadores ativos** podem conduzir substratos através da membrana contra um gradiente de concentração, alguns usando energia fornecida diretamente por uma reação química (transportadores ativos primários) e alguns acoplando o transporte ladeira acima de um substrato com o transporte ladeira abaixo de outro (transportadores ativos secundários). Agora serão consideradas algumas das principais famílias de transportadores e canais mais representativas e bem estudadas. Você encontrará algumas dessas no Capítulo 12, quando será discutida a sinalização transmembrana, e novamente em capítulos seguintes no contexto das vias metabólicas nas quais eles participam.

## O transportador de glicose de eritrócitos controla o transporte passivo

O metabolismo produtor de energia em eritrócitos depende de um suprimento constante de glicose do plasma sanguíneo, no qual a concentração de glicose é mantida em torno de 5 mM. A glicose entra no eritrócito por difusão facilitada por meio de um transportador específico de glicose, a uma velocidade aproximadamente 50.000 vezes maior do que a difusão transmembrana não catalisada. O transportador de glicose do eritrócito (chamado de GLUT1 para distingui-lo do transportador de glicose relacionado em outros tecidos) é uma proteína integral de membrana do tipo III ($M_r$ ~45.000) com 12 segmentos hidrofóbicos, e se acredita que cada segmento forme uma hélice que atravessa a membrana. A estrutura detalhada do GLUT1 ainda não é conhecida, mas um modelo plausível sugere que um conjunto lado a lado de várias hélices produza um canal transmembrana revestido com resíduos hidrofílicos que podem fazer ligações de hidrogênio com a glicose à medida que ela se move através do poro aquoso (**Figura 11-30**).

O processo do transporte de glicose pode ser descrito por sua analogia com uma reação enzimática na qual o "substrato" seria a glicose fora da célula ($S_{fora}$), o "produto" seria a glicose dentro ($S_{dentro}$), e a "enzima" seria o transportador, T. Quando a velocidade inicial de captação de glicose é medida em função da concentração externa de glicose (**Figura 11-31**), a curva resultante é hiperbólica: em altas concentrações externas de glicose, a velocidade de captação se aproxima de $V_{máx}$. Formalmente, tal processo de transporte pode ser descrito pelas equações

$$\begin{array}{ccc} S_{fora} + T_1 & \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} & S_{fora} \bullet T_1 \\ k_{-4} \Big\Downarrow\Big\Uparrow k_4 & & k_{-2} \Big\Uparrow\Big\Downarrow k_2 \\ S_{dentro} + T_2 & \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} & S_{dentro} \bullet T_2 \end{array}$$

na qual $k_1$, $k_{-1}$, e assim por diante, são as constantes de velocidade para as reações direta e inversa para cada etapa; $T_1$ é a conformação do transportador na qual o sítio de liga-

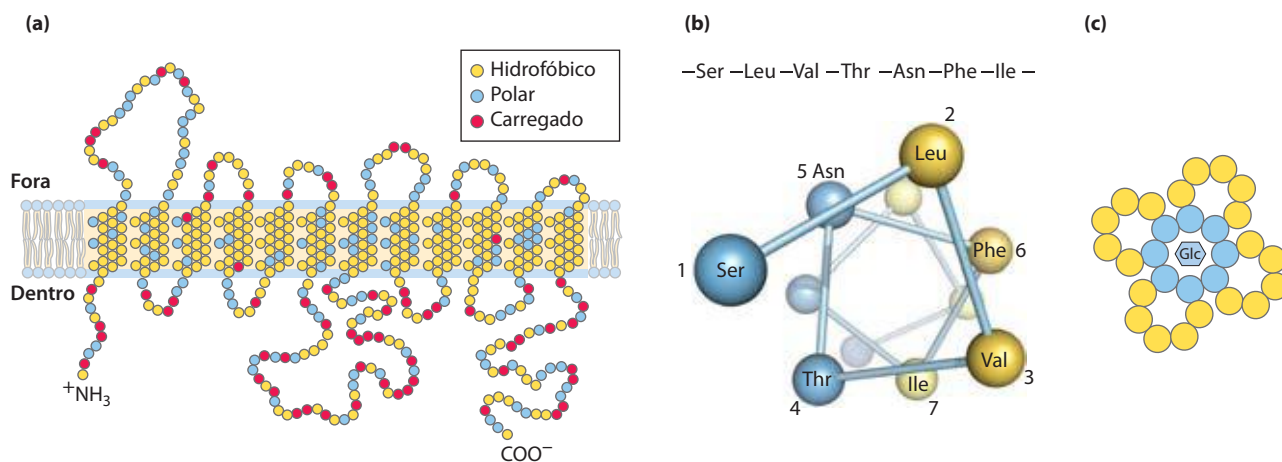



**FIGURA 11-30 Topologia da membrana do transportador de glicose GLUT1.** **(a)** As hélices transmembrana estão representadas aqui como fileiras oblíquas (angulares) com três ou quatro resíduos de aminoácidos, cada fileira representando uma volta da hélice $\alpha$. Nove das doze hélices contêm três ou mais resíduos polares ou carregados (em azul ou vermelho), geralmente separados por vários resíduos hidrofóbicos (em amarelo). Esta representação de topologia não tem a intenção de ilustrar a estrutura em três dimensões. **(b)** Um diagrama de uma roda helicoidal mostra a distribuição de resíduos polares e apolares na superfície de um segmento helicoidal. A hélice é representada no diagrama supostamente observada ao longo de seu eixo, a partir de sua extremidade aminoterminal. Os resíduos adjacentes na sequência linear estão conectados, e cada resíduo é colocado ao redor da roda na posição que ocupa na hélice; recorde que 3,6 resíduos são necessários para fazer uma volta completa na hélice $\alpha$. Neste exemplo, os resíduos polares (em azul) estão em um lado da hélice e os resíduos hidrofóbicos (em amarelo) estão no outro. Isso é, por definição, uma hélice anfipática. **(c)** A associação lado a lado de quatro hélices anfipáticas, cada qual com sua face orientada para o centro da cavidade central, pode produzir um canal transmembrana revestido com resíduos polares (e carregados). Este canal oferece muitas oportunidades para ligações de hidrogênio com a glicose à medida que ela se move pelo canal.

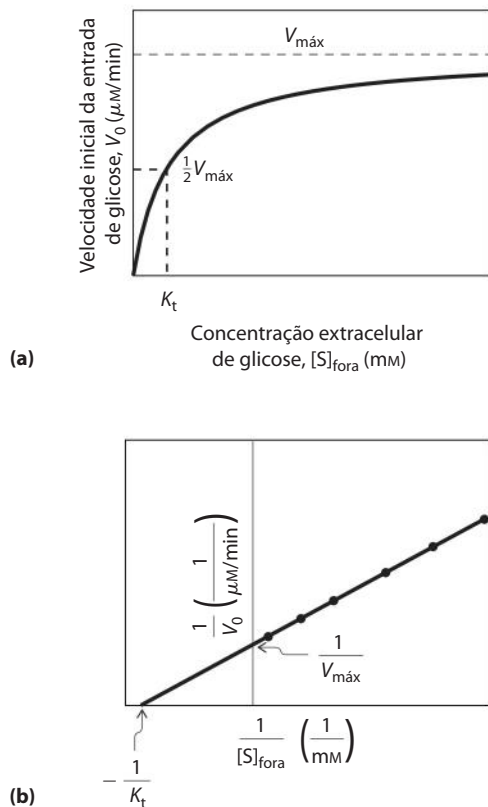



**FIGURA 11-31 Cinética do transporte da glicose para dentro do eritrócito. (a)** A velocidade inicial de entrada de glicose no eritrócito, $V_0$, depende da concentração inicial de glicose do lado de fora, $[S]_{fora}$. **(b)** Gráfico duplo-recíproco dos dados em (a). A cinética da difusão facilitada é análoga à cinética da reação catalisada por uma enzima. Compare esses gráficos com a Figura 6-11 e com a Figura Q-1 no Quadro 6-1. Note que $K_t$ é análogo a $K_m$, a constante de Michaelis.

ção da glicose se posiciona para fora, e $T_2$ é a conformação na qual ele se posiciona para dentro. Os passos estão resumidos na **Figura 11-32**. Já que cada etapa nessa sequência é reversível, o transportador é, em princípio, capaz de mover a glicose para dentro ou para fora da célula. Entretanto, com o GLUT1, a glicose sempre se move a favor de seu gradiente de concentração, que normalmente significa para *dentro* da célula. A glicose que entra na célula em geral é metabolizada imediatamente, e a concentração de glicose intracelular é, portanto, mantida baixa em relação à sua concentração no sangue.

**FIGURA 11-32 Modelo de transporte de glicose para dentro do eritrócito pelo GLUT1.** O transportador existe em duas conformações: $T_1$, com o sítio de ligação de glicose exposto na superfície externa da membrana plasmática, e $T_2$, com o sítio de ligação exposto na superfície interna. O transporte de glicose ocorre em quatro passos. ❶ A glicose do plasma sanguíneo se liga ao sítio estereoespecífico em $T_1$; isso reduz a energia de ativação para ❷ uma mudança conformacional a partir de $glicose_{fora} \cdot T_1$ para $glicose_{dentro} \cdot T_2$, efetuando a passagem transmembrana da glicose. ❸ A glicose é liberada de $T_2$ para o citoplasma, e ❹ o transportador retorna à conformação $T_1$, pronto para transportar outra molécula de glicose.

As equações da velocidade do transporte de glicose podem ser derivadas exatamente como para as reações catalisadas por enzimas (Capítulo 6), produzindo uma expressão análoga à equação de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{máx}[S]_{fora}}{K_t + [S]_{fora}} \qquad (11\text{–}1)$$

onde $V_0$ é a velocidade inicial de acúmulo da glicose dentro da célula quando a sua concentração no meio circundante é $[S]_{fora}$ e $\boldsymbol{K_t}$ ($\boldsymbol{K_{transporte}}$) é uma constante análoga à constante de Michaelis, uma combinação de constantes de velocidade que é característica de cada sistema de transporte. Essa equação descreve a velocidade *inicial,* observada quando $[S]_{dentro} = 0$. Assim como ocorre no caso das reações catalisadas por enzimas, o gráfico de $1/V_0$ em função de $1/[S]_{fora}$ resulta em uma reta crescente da qual pode-se obter valores de $K_t$ e $V_{máx}$ (Figura 11-31b). Quando $[S]_{fora} = K_t$, a taxa de captação é $\frac{1}{2}V_{máx}$; o sistema de transporte está meio saturado. A concentração de glicose no sangue é de 4,5 a 5 mM, próximo a $K_t$, o que garante que GLUT1 esteja quase saturado com o substrato e opere próximo da $V_{máx}$.

Como não há formação ou rompimento de ligações químicas na conversão de $S_{fora}$ para $S_{dentro}$, nem o "substrato" nem o "produto" são intrinsecamente mais estáveis, o processo de entrada é, portanto, completamente reversível. À medida que $[S]_{dentro}$ se aproxima de $[S]_{fora}$, as velocidades de entrada e saída tornam-se iguais. Tal sistema é então incapaz de acumular glicose dentro da célula em concentrações acima daquela do meio que a circunda; ele simplesmente equilibra a glicose nos dois lados da membrana muito mais rapidamente do que ocorreria na ausência de um transportador específico. O GLUT1 é específico para a D-glicose, com $K_t$ medido no valor aproximado de 6 mM. Para os análogos próximos D-manose e D-galactose, que diferem apenas em um grupo hidroxil, os valores de $K_t$ são 20 e 30 mM, respectivamente; e para a L-glicose, $K_t$ excede 3.000 mM. Assim, o GLUT1 tem as três características do transporte passivo: altas taxas de difusão a favor do gradiente de concentração, saturabilidade e especificidade.

Doze transportadores passivos de glicose estão codificados no genoma humano, cada um com suas propriedades cinéticas únicas, padrões de distribuição no tecido e função (Tabela 11-3). No fígado, o GLUT2 transporta glicose para fora dos hepatócitos quando o glicogênio no fígado é degradado para repor glicose sanguínea. O GLUT2 tem um grande $K_t$ (17 mM ou maior) e pode, portanto, responder a níveis aumentados de glicose intracelular (produzidos pela degradação do glicogênio) com o aumento do transporte para

**TABELA 11-3** Transportadores de glicose em humanos

| Transportador | Tecido(s) onde está expresso | $K_t$ (mM)* | Função† |
|---|---|---|---|
| GLUT1 | Ubíquo | 3 | Captação basal de glicose |
| GLUT2 | Fígado, ilhotas pancreáticas, intestino | 17 | No fígado e rim, remoção do excesso de glicose do sangue; no pâncreas, regulação da liberação de insulina |
| GLUT3 | Cérebro (neuronal), testículo (esperma) | 1,4 | Captação basal de glicose |
| GLUT4 | Músculo, gordura, coração | 5 | Atividade aumentada pela insulina |
| GLUT5 | Intestino (principalmente), testículo, rim | 6‡ | Transporte principalmente de frutose |
| GLUT6 | Baço, leucócitos, cérebro | >5 | Possivelmente sem função de transporte |
| GLUT7 | Intestino delgado, colo | 0,3 | — |
| GLUT8 | Testículo | ~2 | — |
| GLUT9 | Fígado, rim | 0,6 | — |
| GLUT10 | Coração, pulmão, cérebro, fígado, músculo, pâncreas, rim | 0,3§ | — |
| GLUT11 | Coração, músculo esquelético, rim | 0,16 | — |
| GLUT12 | Músculo esquelético, coração, próstata, intestino delgado | — | — |

* $K_t$ para a glicose, exceto quando especificado, a partir de Augustin, R. (2010) The protein family of glucose transpot facilitators: it´s not only about glucose after all. *IUBMB Life* **62**, 315-333.
† O traço indica uma função incerta.
‡ $K_M$ para a frutose.
§ $K_M$ para a 2-desoxiglicose.

fora. O músculo esquelético, o músculo cardíaco e o tecido adiposo têm ainda outro transportador de glicose, o GLUT4 ($K_t$ = 5 mM), que é diferente em relação à sua resposta à insulina: sua atividade aumenta quando a insulina sinaliza uma alta concentração de glicose sanguínea, aumentando a taxa de captação de glicose pelo músculo e tecido adiposo (o Quadro 11-1 descreve o efeito da insulina sobre esse transportador).

## O trocador de cloreto-bicarbonato catalisa o cotransporte eletroneutro de ânions através da membrana plasmática

O eritrócito contém outro sistema de difusão facilitada, um trocador de ânion que é essencial ao transporte de $CO_2$ de tecidos como o músculo esquelético e o fígado para os pulmões. O $CO_2$ eliminado a partir da respiração dos tecidos e liberado no plasma sanguíneo entra no eritrócito, onde é convertido em bicarbonato ($HCO_3^-$) pela enzima anidrase carbônica. (Recorde que o $HCO_3^-$ é o tampão principal do pH sanguíneo; ver Figura 2-21). O $HCO_3^-$ retorna ao plasma sanguíneo para ser transportado aos pulmões (**Figura 11-33**). Como o $HCO_3^-$ é muito mais solúvel no plasma sanguíneo do que o $CO_2$, esta via indireta aumenta a capacidade do sangue de carregar o dióxido de carbono dos tecidos aos pulmões. Nos pulmões, o $HCO_3^-$ reentra no eritrócito e é convertido em $CO_2$, quando então é finalmente liberado no espaço pulmonar e exalado. Para ser efetivo, esse transporte requer um movimento muito rápido de $HCO_3^-$ através da membrana do eritrócito.

O **trocador de cloreto-bicarbonato**, também chamado de **proteína trocadora de ânion** (**TA**), aumenta a taxa de transporte através da membrana do eritrócito em mais de um milhão de vezes. Assim como o transpor-

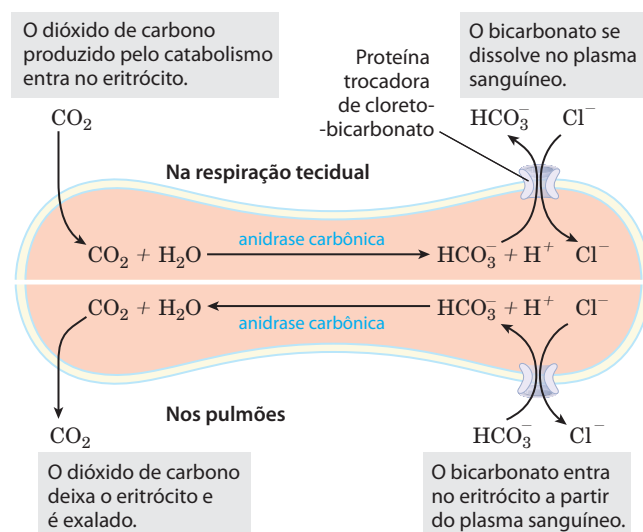



**FIGURA 11-33 Trocador de cloreto-bicarbonato da membrana do eritrócito.** Esse sistema de cotransporte permite a entrada e a saída do $HCO_3^-$ sem alterar o potencial de membrana. Sua função é aumentar a capacidade do sangue de transportar $CO_2$. A metade superior da figura ilustra os eventos que ocorrem na respiração nos tecidos; a metade inferior, os eventos que ocorrem nos pulmões.

## QUADRO 11-1  MEDICINA Defeito no transporte de glicose e água em duas formas de diabetes

Quando a ingestão de uma refeição rica em carboidratos gera uma concentração de glicose sanguínea excedente àquela comum entre as refeições (cerca de 5 mM), o excesso de glicose é captado pelos miócitos dos músculos cardíaco e esquelético (que a armazenam como glicogênio) e pelos adipócitos (que a convertem em triacilgliceróis). A captação de glicose pelos miócitos e adipócitos é mediada pelo transportador de glicose GLUT4. Entre as refeições, alguns GLUT4 estão presentes na membrana plasmática, mas a maioria encontra-se sequestrada nas membranas de pequenas vesículas intracelulares (Figura Q-1). A insulina, liberada pelo pâncreas em resposta à alta concentração de glicose sanguínea, desencadeia o movimento dessas vesículas intracelulares à membrana plasmática, com a qual elas se fundem, levando as moléculas de GLUT4 para a membrana plasmática (ver Figura 12-16). Com mais moléculas de GLUT4 em ação, a taxa de captação de glicose aumenta em 15 vezes ou mais. Quando os níveis de glicose sanguínea retornam ao normal, a liberação de insulina torna-se lenta, e a maioria das moléculas de GLUT4 é removida da membrana plasmática e armazenada em vesículas.

No diabetes melito do tipo I (dependente de insulina), a incapacidade em liberar insulina (e, portanto, mobilizar transportadores de glicose) resulta em baixas taxas de captação de glicose pelo músculo e tecido adiposo. Uma consequência é o período prolongado de glicose sanguínea alta após uma refeição rica em carboidratos. Essa condição é a base para o teste de tolerância à glicose usado para diagnosticar o diabetes (Capítulo 23).

A permeabilidade à água das células epiteliais que revestem o ducto coletor renal ocorre devido à presença de uma aquaporina (AQP2) em suas membranas plasmáticas apicais (voltadas para o lúmen do ducto). A vasopressina (hormônio antidiurético ADH, de *antidiuretic hormone*) regula a retenção de água pela mobilização de moléculas de AQP2 armazenadas em membranas de vesículas dentro das células epiteliais, assim como a insulina mobiliza o GLUT4 no músculo e no tecido adiposo. Quando as vesículas se fundem com a membrana plasmática das células epiteliais, a permeabilidade à água aumenta muito e mais água é reabsorvida do ducto coletor e retorna ao sangue. Quando o nível de vasopressina diminui, AQP2 é ressequestrada nas vesículas, reduzindo a retenção de água. Na doença relativamente rara de diabetes insípido, um defeito genético na AQP2 leva a uma deficiência na reabsorção de água pelo rim. O resultado é a excreção de volumes copiosos de urina muito diluída. Se o indivíduo beber água suficiente para repor o que foi perdido pela urina, não há consequências sérias do ponto de vista médico, porém a ingestão insuficiente de água leva à desidratação e desequilíbrio nos eletrólitos sanguíneos, que pode levar à fadiga, dor de cabeça, dor muscular ou até mesmo à morte.



**FIGURA Q-1** O transporte de glicose para um miócito pelo GLUT4 é regulado pela insulina.

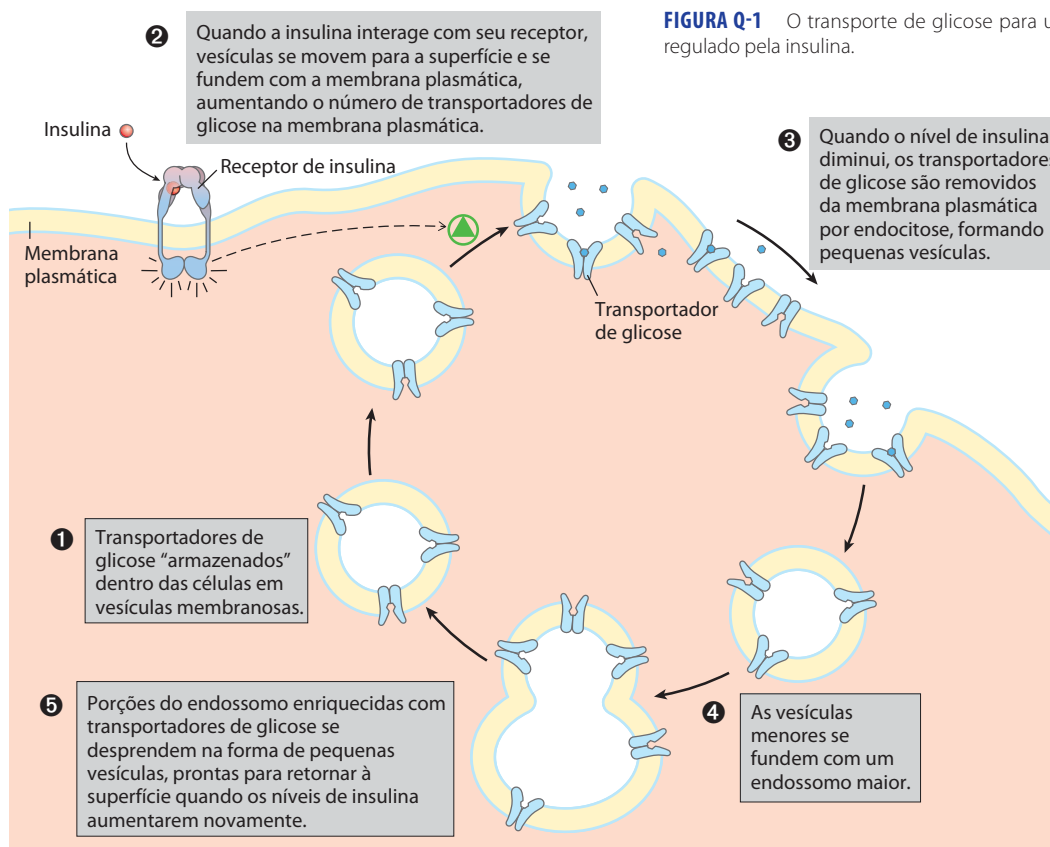
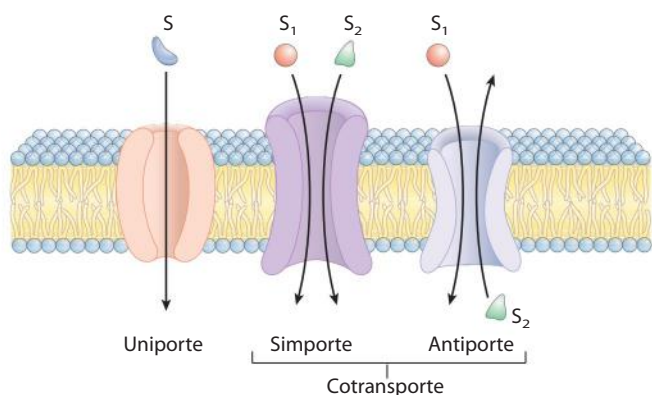



**FIGURA 11-34 Três classes gerais de sistemas de transporte.** Os transportadores diferem no número de solutos (substratos) transportados e na direção na qual cada soluto se move. Exemplos dos três tipos de transportadores são discutidos no texto. Observe que essa classificação não informa se esses processos requerem energia (transporte ativo) ou se são independentes de energia (transporte passivo).

**(a)** Transporte ativo primário **(b)** Transporte ativo secundário

**FIGURA 11-35 Dois tipos de transporte ativo. (a)** No transporte ativo primário, a energia liberada pela hidrólise de ATP impulsiona o movimento de soluto ($S_1$) contra o gradiente eletroquímico. **(b)** No transporte ativo secundário, o gradiente de um íon X ($S_1$) (geralmente $Na^+$) se estabelece por transporte ativo primário. O movimento de X ($S_1$) a favor de seu gradiente eletroquímico provê agora energia para impulsionar o cotransporte de um segundo soluto ($S_2$) contra seu gradiente eletroquímico.

tador de glicose, ela é uma proteína integral que provavelmente atravessa a membrana pelo menos 12 vezes. Essa proteína é responsável por mediar o movimento simultâneo de dois ânions: para cada íon de $HCO_3^-$ que se move em uma direção, um íon $Cl^-$ se move na direção contrária, sem transferência efetiva de carga; a troca é **eletroneutra**. O acoplamento entre os movimentos de $Cl^-$ e de $HCO_3^-$ é obrigatório; na ausência do cloreto, o transporte de bicarbonato para. Em relação a isso, o trocador de ânions é típico desses sistemas, chamados de **sistemas de cotransporte**, que simultaneamente carregam dois solutos através da membrana (**Figura 11-34**). Quando, como nesse caso, os dois substratos movem-se em direções opostas, o processo é **antiporte**. No **simporte**, dois substratos movem-se simultaneamente na mesma direção. Transportadores que carregam apenas um substrato, como o transportador de glicose do eritrócito, são conhecidos como sistemas **uniporte**.

O genoma humano tem genes para três trocadores de cloreto-bicarbonato muito parecidos, todos com a mesma previsão de topologia transmembrana. Os eritrócitos contêm o transportador TA1, o TA2 é proeminente no fígado, e o TA3 está presente em membranas plasmáticas no cérebro, no coração e na retina. Trocadores de ânions semelhantes também são encontrados em plantas e microrganismos.

## O transporte ativo resulta em movimento de soluto contra um gradiente de concentração ou eletroquímico

No transporte passivo, as espécies transportadas sempre se movem a favor de seu gradiente eletroquímico e não se acumulam além da concentração de equilíbrio. Em contraposição, o **transporte ativo** resulta em acúmulo de soluto acima do ponto de equilíbrio. O transporte ativo é termodinamicamente desfavorável (endergônico) e ocorre apenas acoplado (direta ou indiretamente) a um processo exergônico como a absorção de luz solar, uma reação de oxidação, uma hidrólise de ATP, ou o fluxo concomitante de alguma outra espécie química a favor de seu gradiente eletroquímico. No **transporte ativo primário**, o acúmulo de soluto é acoplado diretamente a uma reação química exergônica, como na conversão de ATP a ADP + $P_i$ (**Figura 11-35**). **O transporte ativo secundário** ocorre quando o transporte endergônico ("morro acima") de um soluto está acoplado a um fluxo exergônico ("morro abaixo") de um soluto diferente que era originalmente bombeado para cima pelo transporte ativo primário.

A quantidade de energia necessária para o transporte de um soluto contra o gradiente pode ser calculada a partir do gradiente inicial de concentração. A equação geral para a variação de energia livre no processo químico que converte S a P é

$$\Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln ([P]/[S]) \quad (11\text{-}2)$$

onde $\Delta G'^0$ é a variação de energia livre padrão, $R$ é a constante dos gases, 8,315 J/mol · K, e $T$ é a temperatura absoluta. Quando a "reação" é simplesmente o transporte de um soluto de uma região onde sua concentração é $C_1$ para uma região onde sua concentração é $C_2$, não há formação ou rompimento de ligações e $\Delta G'^{\circ}$ é zero. A variação de energia livre para o transporte, $\Delta G_t$, é então

$$\Delta G_t = RT \ln (C_2/C_1) \quad (11\text{-}3)$$

Se houver uma diferença de 10 vezes na concentração entre dois compartimentos, o custo para movimentar 1 mol de um soluto não carregado a 25°C "morro acima" através da membrana que separa os dois compartimentos é

$$\Delta G_t = (8{,}315 \text{ J/mol} \cdot \text{K})(298\text{K}) \ln (10/1) = 5.700 \text{ J/mol}$$
$$= 5{,}7 \text{ kJ/mol}$$

A Equação 11-3 serve para todos os solutos não carregados.

**PROBLEMA RESOLVIDO 11-1** **Custo de energia para bombear um soluto não carregado**

Calcule o custo de energia (variação de energia livre) para bombear um soluto não carregado contra um gradiente de concentração de $1{,}0 \times 10^4$ vezes a 25°C.

**Solução:** Comece com a Equação 11-3. Substitua ($C_2/C_1$) por $1{,}0 \times 10^4$, $R$ por 8,315 J/mol · K e $T$ por 298 K:

$$\begin{aligned}\Delta G_t &= RT \ln (C_2/C_1) \\ &= (8{,}315 \text{ J/mol} \cdot \text{K})\,(298 \text{ K}) \ln (1{,}0 \times 10^4) \\ &= 23 \text{ kJ/mol}\end{aligned}$$

Quando o soluto é um *íon*, seu movimento sem o acompanhamento de um contraíon resulta em uma separação endergônica de cargas positivas e negativas, produzindo um potencial elétrico; diz-se que tal transporte é **eletrogênico**. O custo energético de mover um íon depende do potencial eletroquímico (Figura 11-27), a soma dos gradientes químico e elétrico:

$$\Delta G_t = RT \ln (C_2/C_1) + Z\mathcal{F}\,\Delta\psi \qquad (11\text{-}4)$$

onde $Z$ é a carga do íon, $\mathcal{F}$ é a constante de Faraday (96.480 J/V · mol), e $\Delta\psi$ é o potencial elétrico transmembrana (em volts). As células eucarióticas têm potenciais de membrana plasmática geralmente da ordem de 0,05 V (sendo o lado interno negativo em relação ao externo), de modo que o segundo termo da Equação 11-4 pode contribuir significativamente na variação de energia livre total para o transporte do íon. A maioria das células mantém uma diferença de mais de 10 vezes na concentração de íons através das membranas plasmática ou intracelular, e para muitas células e tecidos, o transporte ativo é, portanto, o principal processo de consumo de energia.

**PROBLEMA RESOLVIDO 11-2** **Custo de energia para bombear um soluto carregado**

Calcule o custo de energia (variação de energia livre) para bombear o $Ca^{2+}$ do citosol, onde sua concentração é de aproximadamente $1{,}0 \times 10^{-7}$ M, para o fluido extracelular, onde a sua concentração é aproximadamente 1,0 mM. Suponha uma temperatura de 37°C (temperatura corporal dos mamíferos) e um potencial transmembrana padrão de 50 mV (negativo dentro) para a membrana plasmática.

**Solução:** Neste cálculo, tanto o gradiente de concentração quanto o potencial elétrico devem ser levados em consideração. Na Equação 11-4, substitua $R$ por 8,315 J/mol · K e $T$ por 310 K, $C_2$ por $1{,}0 \times 10^{-3}$, $C_1$ por $1{,}0 \times 10^{-7}$, $Z$ por 96.500 J/V · mol, $\mathcal{F}$ por +2 (carga do íon $Ca^{2+}$), e $\Delta\psi$ por 0,050 V. Observe que o potencial transmembrana é 50 mV (negativo dentro), de modo que a variação do potencial quando o íon se move de dentro para fora é de 50 mV.

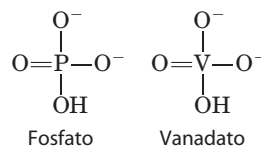
$$\begin{aligned}\Delta G_t &= RT \ln (C_2/C_1) + Z\mathcal{F}\Delta\psi \\ &= (8{,}315 \text{ J/mol·K})(310 \text{ K}) \ln \frac{1{,}0 \times 10^{-3}}{1{,}0 \times 10^{-7}} + \\ &\quad 2(96.500 \text{ J/V·mol})(0{,}050 \text{ V}) \\ &= 33 \text{ kJ/mol}\end{aligned}$$

O mecanismo de transporte ativo é de fundamental importância em biologia. Como será visto no Capítulo 19, o ATP é formado nas mitocôndrias e nos cloroplastos por um mecanismo que é essencialmente um transporte iônico movido a ATP operando de forma reversa. A energia que se torna disponível pelo fluxo espontâneo de prótons através da membrana pode ser calculada a partir da Equação 11-4; lembre que $\Delta G$ para o fluxo *para baixo* do gradiente eletroquímico tem um valor negativo, e $\Delta G$ para o transporte de íons *contra* o gradiente eletroquímico tem um valor positivo.

## ATPases do tipo P sofrem fosforilação durante seus ciclos catalíticos

A família de transportadores ativos chamados de **ATPases do tipo P** são transportadores de cátions que são fosforilados de forma reversível por ATP (por isso o nome tipo P) como parte do ciclo de transporte. A fosforilação força uma mudança conformacional que é fundamental para o movimento do cátion através da membrana. O genoma humano codifica pelo menos 70 ATPases do tipo P que possuem semelhanças quanto à sequência de aminoácidos e topologia, especialmente perto do resíduo Asp que sofre fosforilação. Todas são proteínas integrais com 8 ou 10 regiões preditivas que atravessam a membrana em um único polipeptídeo (tipo III na Figura 11-9), e todas são sensíveis à inibição pelo **vanadato,** análogo do fosfato.

O⁻ / O=P—O⁻ / OH — Fosfato

O⁻ / O=V—O⁻ / OH — Vanadato

As ATPases do tipo P são muito comuns em eucariotos e bactérias. A $Na^+K^+$-ATPase de células animais (antiporte para os íons $Na^+$ e $K^+$) e a $H^+$-ATPase da membrana plasmática de plantas e fungos determinam o potencial eletroquímico transmembrana nas células ao estabelecer os gradientes iônicos através da membrana. Esses gradientes proporcionam a força propulsora para o transporte ativo secundário e também formam a base da sinalização elétrica em neurônios. Em tecidos animais, a **bomba $Ca^{2+}$-ATPase do retículo sarcoplasmático/endoplasmático** (**SERCA**, de *sarcoplasmic and endoplasmic reticulum calcium*) e a bomba $Ca^{2+}$-ATPase da membrana plasmática são uniportadores dos íons $Ca^{2+}$, que juntos mantêm o nível citosólico de $Ca^{2+}$ abaixo de 1 $\mu$M. Células parietais que re-

vestem o estômago de mamíferos têm uma ATPase do tipo P que bombeia $H^+$ e $K^+$ através da membrana plasmática, acidificando o conteúdo do estômago. As flipases lipídicas, como mencionado anteriormente, são estrutural e funcionalmente relacionadas aos transportadores do tipo P. As bactérias e eucariotos usam ATPases do tipo P para bombear íons metálicos pesados tóxicos como o $Cd^{2+}$ e o $Cu^{2+}$ para fora.

As bombas do tipo P têm estruturas (**Figura 11-36**) e mecanismos semelhantes. O mecanismo postulado para as ATPases do tipo P leva em consideração as grandes mudanças conformacionais e a fosforilação-desfosforilação do resíduo crítico Asp no domínio P que ocorrem durante o ciclo catalítico. Para a bomba SERCA (**Figura 11-37**), cada ciclo catalítico move dois íons $Ca^{2+}$ através da membrana e converte um ATP a ADP e $P_i$. O ATP tem duas funções nesse mecanismo, um catalítico e outro modulatório. O papel da ligação do ATP seguida da transferência do fosforil à enzima é promover a interconversão de duas conformações (E1 e E2) do transportador. Na conformação E1, dois sítios de ligação do $Ca^{2+}$ são expostos ao lado citosólico do RE ou retículo sarcoplasmático e ligam o $Ca^{2+}$ com grande afinidade. A ligação de ATP e a fosforilação do Asp conduzem a uma mudança conformacional de E1 a E2 na qual os sítios de ligação do $Ca^{2+}$ são agora expostos ao lado luminal da membrana e sua afinidade pelo $Ca^{2+}$ é muito reduzida, causando a liberação de $Ca^{2+}$ para o lúmen. Por meio desse mecanismo, a energia liberada pela hidrólise de ATP durante um ciclo de fosforilação-desfosforilação mobiliza o $Ca^{2+}$ através da membrana contra um grande gradiente eletroquímico.

Jens Skou

Uma variação desse mecanismo básico é vista na **$Na^+K^+$-ATPase** da membrana plasmática, descoberta por Jens Skou em 1957. Esse cotransportador acopla fosforilação-desfosforilação do resíduo Asp crítico ao movimento simultâneo, tanto de $Na^+$ quanto de $K^+$, contra seus gradientes eletroquímicos. A $Na^+K^+$-ATPase é responsável por manter baixa a concentração de $Na^+$ e alta a de $K^+$ na célula, em relação ao fluido extracelular (**Figura 11-38**). Para cada molécula de ATP convertida a ADP e $P_i$, o trans-

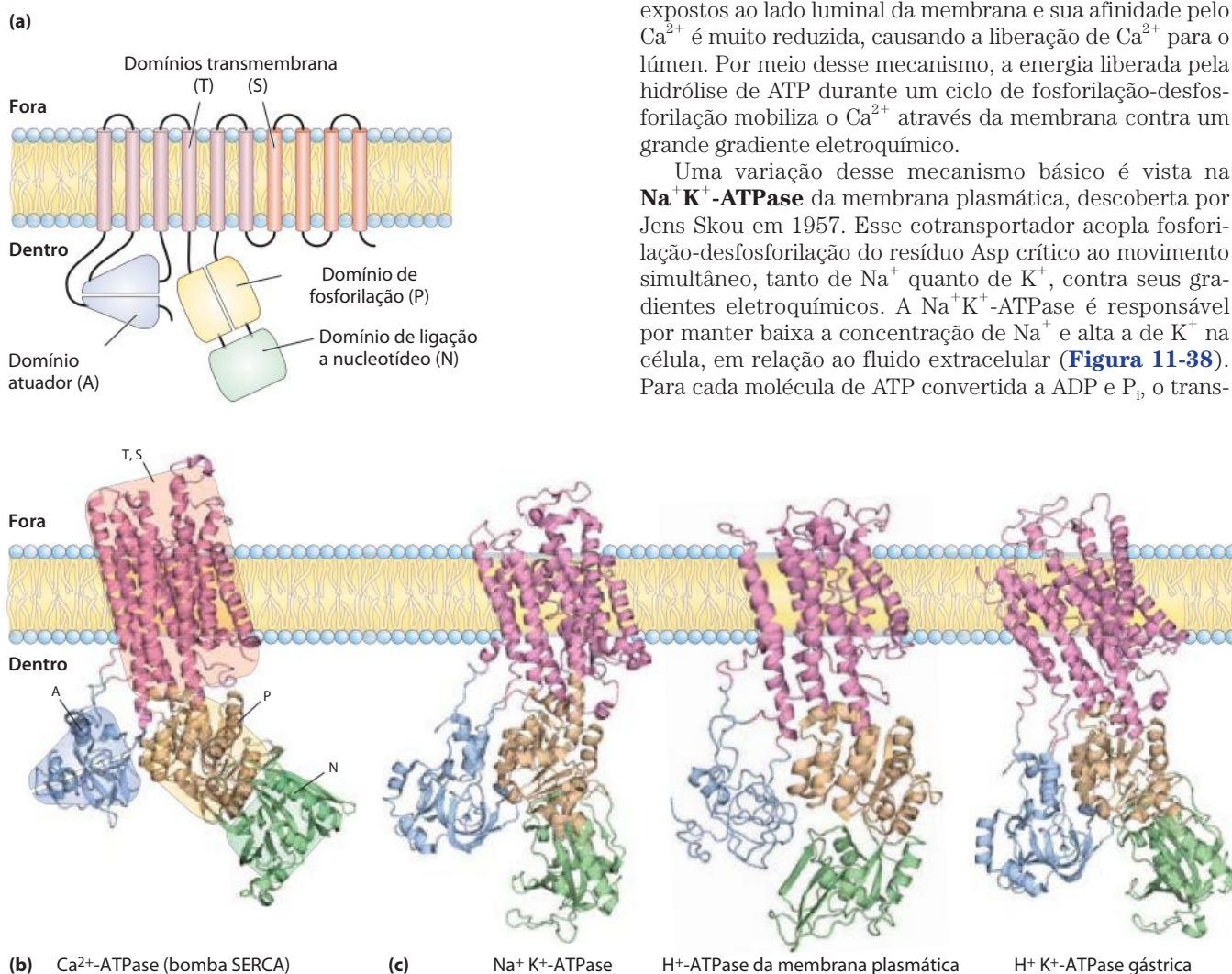



**FIGURA 11-36 A estrutura geral das ATPases do tipo P. (a)** As ATPases do tipo P possuem três domínios citoplasmáticos (A, N e P) e dois domínios transmembrana (T e S) que consistem em múltiplas hélices. O domínio N (nucleotídeo) liga ATP e $Mg^{2+}$, e tem atividade de proteína-cinase que fosforila o resíduo Asp específico encontrado no domínio P (fosforilado) de todas ATPases do tipo P. O domínio A (atuador) possui atividade de proteína fosfatase e remove o grupo fosforil do resíduo Asp em cada ciclo catalítico da bomba. O domínio transporte (T), com seis hélices transmembrana, inclui a estrutura transportadora de íon, e mais outras quatro hélices transmembrana apóiam o domínio (S), que provém o suporte fisico ao domínio de transporte e pode ter outra função especializada em certas ATPases do tipo P. Os sítios de ligação para os íons a serem transportados estão próximos ao meio da membrana, 40 a 50 Å do resíduo Asp fosforilado – assim, a fosforilação-desfosforilação do Asp não afeta *diretamente* a ligação do íon. O domínio A comunica movimentos dos domínios N e P aos sítios de ligação dos íons. **(b)** Uma representação em fita da $Ca^{2+}$ ATPase (bomba SERCA) (PDB 1T5S). O ATP se liga ao domínio N e os íons $Ca^{2+}$ a serem transportados ligam-se ao domínio T. **(c)** Outras ATPases do tipo P possuem estruturas de domínios, e provavelmente mecanismos, como a bomba SERCA: a $Na^+K^+$ATPase (PDB ID 3KDP), a $H^+$ ATPase da membrana plasmática (PDB ID 3B8C) e a $H^+K^+$ ATPase gástrica (derivada do PDB ID 3IXZ).

**FIGURA 11-37 Mecanismo postulado para a bomba SERCA.** O ciclo do transporte começa com a proteína na conformação E1, com os sítios de ligação ao $Ca^{2+}$ expostos para o citosol. Dois íons $Ca^{2+}$ se ligam, e então o ATP se liga ao transportador e fosforila o $Asp^{351}$, formando E1-P. A fosforilação favorece a segunda conformação, E2-P, na qual os sítios de ligação ao $Ca^{2+}$, agora com uma afinidade reduzida ao $Ca^{2+}$, estão acessíveis do outro lado da membrana (espaço extracelular ou lúmen) e o $Ca^{2+}$ se difunde para fora. Finalmente, E2-P é desfosforilado, retornando a proteína à conformação E1 para outro ciclo de transporte.

portador desloca dois íons $K^+$ para dentro e três íons $Na^+$ para fora através da membrana plasmática. O cotransporte é, portanto, eletrogênico – ele cria uma separação líquida de cargas através da membrana; em animais, isso produz o potencial de membrana de −50 a −70 mV (o lado de dentro é negativo em relação ao de fora) que é característico da maioria das células e é essencial para a condução do potencial de ação em neurônios. O papel fundamental da $Na^+K^+$-ATPase é refletido na energia investida nesta única reação: aproximadamente 25% do consumo total de energia de um ser humano em repouso!

## ATPases do tipo V e do tipo F são bombas de prótons impulsionadas por ATP

**ATPases do tipo V**, classe de ATPase transportadora de prótons, são responsáveis por acidificarem compartimentos intracelulares em muitos organismos (assim, o *V* vem de vacuolar). Bombas de prótons desse tipo mantêm o pH entre 3 e 6 nos vacúolos de fungos e plantas superiores, bem abaixo daquele do citosol (pH 7,5). ATPases do tipo V são também responsáveis pela acidificação de lisossomos, endossomos, do aparelho de Golgi e de vesículas secretoras em células animais. Todas as ATPases do tipo V apresentam uma estrutura complexa semelhante, com um domínio ($V_o$) integral (transmembrana) que serve como canal de prótons, e um domínio periférico ($V_1$) que contém o sítio de ligação de ATP e a atividade da ATPase (**Figura 11-39a**). A estrutura é semelhante à das ATPases do tipo F já bem caracterizadas.

Os transportadores **ATPases do tipo F** ativos catalisam a passagem transmembrana de prótons "morro acima" impulsionados pela hidrólise de ATP. A designação "do tipo F" provém da identificação dessas ATPases com *f*atores acoplados à energia. O complexo proteico integral de membrana $F_o$ (**Figura 11-39b**); o subscrito *o* indica sua inibição pelo fármaco

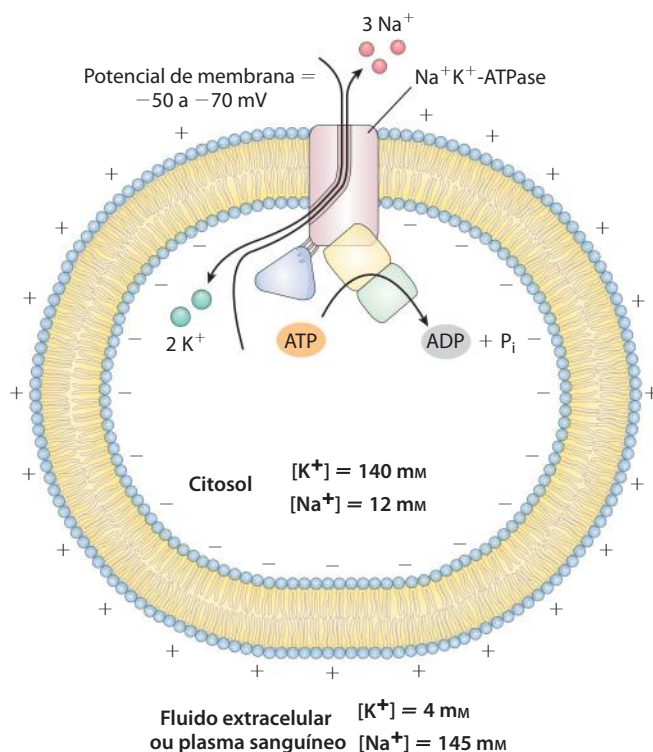



**FIGURA 11-38 Papel da $Na^+K^+$-ATPase em células animais.** Em células animais, o sistema de transporte ativo é responsável principalmente pelo estabelecimento e manutenção das concentrações intracelulares de $Na^+$ e $K^+$ e pela geração do potencial de membrana. Ele faz isso ao movimentar três $Na^+$ para fora da célula para cada dois $K^+$ que move para dentro. O potencial elétrico através da membrana plasmática é fundamental na sinalização de neurônios, e o gradiente de $Na^+$ é usado para impulsionar "morro acima" o cotransporte de solutos em muitos tipos celulares.

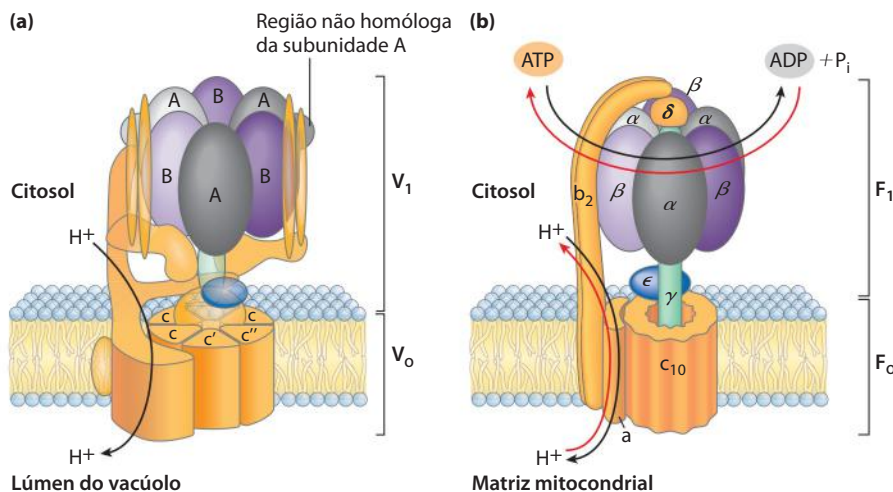



**FIGURA 11-39 Duas bombas de prótons com estruturas similares** **(a)** A ATPase $H^+$ $V_oV_1$ usa ATP para bombear prótons para dentro de vacúolos e lisossomos, criando seus pHs internos baixos. Ela tem um domínio integral (inserido na membrana) $V_o$ (em cor de laranja) que inclui subunidades múltiplas idênticas, e um domínio periférico que se projeta para o citosol e que contém o sítio de hidrólise de ATP localizado em três subunidades idênticas B (em roxo). **(b)** A ATPase $F_oF_1$/ATP-sintase da mitocôndria possui um domínio integral, $F_o$ (em cor de laranja), com múltiplas cópias da subunidade c, e um domínio periférico, $F_1$, que consiste em três subunidades $\alpha$, três subunidades $\beta$, e uma haste central unidas ao domínio integral. $F_o$ e presumivelmente $V_o$ fornecem um canal transmembrana pelo qual prótons são bombeados à medida que o ATP é hidrolisado na subunidade $\beta$ de $F_1$ (subunidades B de $V_1$). O mecanismo notável pelo qual a hidrólise de ATP é acoplada ao movimento do próton é descrito em detalhe no Capítulo 19. Ele envolve a rotação de $F_o$ no plano da membrana. As estruturas da ATPase $V_oV_1$ e seus análogos ATPase $A_oA_1$ (de arqueias) e ATPase $CF_oCF_1$ (de cloroplastos) são essencialmente semelhantes às da ATPase $F_oF_1$ e os mecanismos também estão conservados. Um transportador de próton impulsionado por ATP também pode catalisar a síntese de ATP (setas vermelhas) à medida que prótons fluem a favor de seu gradiente eletroquímico. Essa é a reação central no processo de fosforilação oxidativa e fotofosforilação, ambos descritos em detalhe no Capítulo 19.

oligomicina, provê uma via transmembrana para prótons, e a proteína periférica $F_1$ (o subscrito *1* indica que esse foi o primeiro entre vários fatores isolados da mitocôndria) usa a energia do ATP para mover prótons "morro acima" (para uma região de maior concentração de $H^+$). A organização $F_oF_1$ das bombas de prótons deve ter se desenvolvido muito precocemente na evolução. Bactérias como a *E. coli* usam uma ATPase $F_oF_1$ complexa na sua membrana plasmática para bombear prótons para fora, e as arquibactérias têm uma bomba de prótons semelhante, a ATPase $A_oA_1$.

Como todas as enzimas, as ATPases do tipo F catalisam suas reações em ambas as direções. Assim, um gradiente de prótons suficientemente grande pode suprir a energia para conduzir a reação reversa, a síntese de ATP (Figura 11-39b). Quando funcionam nesse sentido, as ATPases do tipo F são mais apropriadamente chamadas de **ATP-sintases**. As ATP-sintases são fundamentais para a produção de ATP na mitocôndria durante a fosforilação oxidativa e em cloroplastos durante a fotofosforilação, assim como em bactérias e arquibactérias. O gradiente de prótons necessário para conduzir a síntese de ATP é produzido por outros tipos de bombas de prótons energizadas pela oxidação do substrato ou luz solar. Será feita uma descrição detalhada desses processos no Capítulo 19 (p. 750).

## Transportadores ABC usam ATP para impulsionar o transporte ativo de uma grande variedade de substratos

**Os transportadores ABC** (**Figura 11-40**) constituem uma grande família de transportadores dependentes de ATP que bombeiam aminoácidos, peptídeos, proteínas, íons metálicos, vários lipídeos, sais biliares e muitos compostos hidrofóbicos, incluindo fármacos, para fora das células contra um gradiente de concentração. Um transportador ABC em humanos, o **transportador multifármacos** (**MDR1**, *de multidrug transporter*, também chamado de **glicoproteína P**), é responsável pela impressionante resistência de certos tumores a alguns fármacos antitumor geralmente eficazes. O MDR1 tem especificidade ampla para compostos hidrofóbicos, incluindo, por exemplo, os fármacos quimioterápicos adriamicina, doxorrubicina e vinblastina. Ao bombear esses fármacos para fora da célula, o transportador impede o seu acúmulo no tumor e assim bloqueia seus efeitos terapêuticos. O MDR1 (Figura 11-40a) é uma proteína integral de membrana ($M_r$ 170.000) com duas metades homólogas, cada uma delas com seis hélices transmembrana e um domínio de ligação a ATP ("cassete"), que dão o nome à família: ABC, sigla do inglês ATP-*Binding Cassette*, ou transportadores cassete de ligação ao ATP. A superexpressão de MDR1 está associada com a falha no tratamento de câncer de fígado, rim e colo. Um transportador ABC relacionado, o ABCC1, está superexpresso em células cancerosas de próstata, pulmão e mama, resistentes ao fármaco. Inibidores altamente seletivos de transportadores multifármacos, que se poderia esperar serem capazes de aumentar a efetividade dos fármacos antitumor, caso contrário seriam bombeados para fora das células tumorais, são objetos de descobertas e modelagens de fármacos atuais. Porque transportadores multifármacos têm sido conservados na evolução? O MDR1 impede a entrada de compostos tóxicos na membrana placentária e na barreira sangue-cérebro, que de outra forma lesariam o feto ou o cérebro.

Transportadores ABC também estão presentes em animais mais simples, e em plantas e microrganismos. A leve-

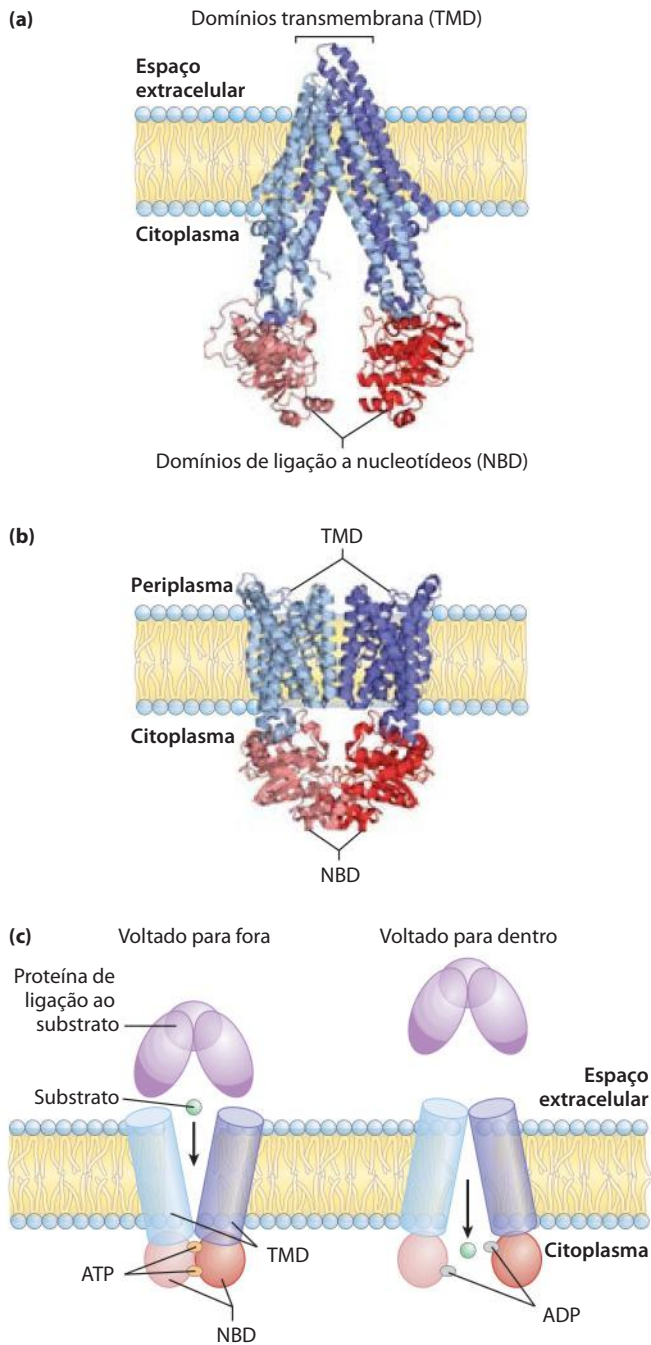



**FIGURA 11-40 Dois transportadores ABC. (a)** O transportador multifármacos de células animais, (MDR1, também chamado de glicoproteína P: PDB IB 3G60) responsável por bombear uma variedade de fármacos antitumor para fora de células humanas, tem duas metades homólogas (em azul e azul-claro), cada uma com seis hélices transmembrana em dois domínios transmembrana (TMD, de ***t****rans****m****embrane* ***d****omain*; em azul) e um domínio citoplasmático de ligação a nucleotídeos (NBD, de ***n****ucleotide-****b****inding* ***d****omains*; em vermelho). **(b)** O importador da vitamina $B_{12}$, BtuCD (PDB ID 1 L7V) da *E. coli,* é um homodímero com 10 hélices transmembrana (em azul e azul-claro) em cada monômero, e dois domínios NBD (em vermelho) que se estendem para o citoplasma. **(c)** Mecanismos propostos para o acoplamento da hidrólise de ATP ao transporte da vitamina $B_{12}$ no transportador ABC da *E. coli*. O substrato é trazido ao transportador no lado periplasmático por uma proteína de ligação específica do substrato. Com o ATP ligado aos sítios NBD, o transportador abre-se para o lado de fora (periplasma), mas no momento que o substrato se liga e o ATP hidrolisa para ADP + $P_i$, uma mudança conformacional expõe o substrato à superfície interna e ele difunde-se do transportador para o citosol.

dura tem 31 genes que codificam os transportadores ABC, a *Drosophila* tem 56, e a *E. coli* tem 80, representando 2% de todo seu genoma. Transportadores ABC, usados pela *E. coli* e outras bactérias para importar vitaminas essenciais como a $B_{12}$ (Figura 11-40b), são presumivelmente precursores evolutivos dos MDRs de células animais. A presença dos transportadores ABC que conferem resistência aos antibióticos em micróbios patogênicos (*Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Candida albicans, Neisseria gonorrhoeae* e *Plasmodium falciparum*) é uma preocupação séria de saúde pública, e faz esses transportadores serem alvos interessantes para a modelagem de fármacos. ■

Todos os transportadores ABC possuem dois domínios de ligação a nucleotídeos (NBD, *de nucleotide binding domains*) e dois domínios transmembrana contendo múltiplas hélices transmembrana. Em alguns casos, todos esses domínios se apresentam como um único e longo polipeptídeo; outros transportadores ABC possuem duas subunidades, cada uma contribuindo com um NBD e um domínio com seis hélices transmembrana. Muitos transportadores ABC estão na membrana plasmática, mas alguns tipos também são encontrados no retículo endoplasmático, em membranas de mitocôndrias e lisossomos. A proteína CFTR (ver Quadro 11-2) é um caso interessante de canal iônico (para o $Cl^-$) acionado pela hidrólise de ATP, que é aparentemente derivado de um transportador ABC no qual a evolução eliminou a função de bomba, mas manteve a de canal funcional.

Os NBD de todas as proteínas ABC são semelhantes em sequência e presumivelmente em estrutura tridimensional; eles são o motor molecular conservado que pode ser acoplado a uma grande variedade de bombas e canais. Quando acoplado a uma bomba, o motor movido a ATP desloca solutos contra o gradiente de concentração. A estequiometria das bombas ABC é de aproximadamente um ATP hidrolisado por molécula de substrato transportado, mas nem o mecanismo de acoplamento, nem o sítio de ligação do substrato estão completamente bem compreendidos.

Alguns transportadores ABC têm especificidade muito alta para um único substrato; outros são mais promíscuos. O genoma humano contém no mínimo 48 genes que codificam os transportadores ABC, muitos dos quais estão envolvidos com a manutenção da bicamada lipídica e com o transporte de esteróis, derivados de esteróis e ácidos graxos por todo o corpo. As flipases que movem lipídeos de membrana de uma lâmina da bicamada para a outra são transportadores ABC, e a maquinaria celular para exportar o excesso de colesterol inclui um transportador ABC. Mutações em genes que codificam algumas dessas proteínas contribuem para várias doenças genéticas, incluindo fibrose cística (Quadro 11-2), doença de Tangier (p. 874), degeneração da retina, anemia e falência do fígado. ■

## Gradientes iônicos provêm a energia necessária para o transporte ativo secundário

Os gradientes iônicos formados pelo transporte primário de $Na^+$ ou $H^+$ podem prover a força propulsora para o cotransporte de outros solutos. Muitos tipos celulares contêm sistemas de transporte que acoplam o fluxo espontâneo "morro abaixo" de íons ao bombeamento simultâneo "morro acima" de outro íon, açúcar ou aminoácido (Tabela 11-4).

## QUADRO 11-2  MEDICINA Um canal iônico defeituoso na fibrose cística

A fibrose cística (FC) é uma doença hereditária humana séria e relativamente comum. Cerca de 5% de todos os americanos brancos são portadores, tendo uma cópia defeituosa do gene e uma normal. Apenas indivíduos com duas cópias defeituosas apresentam sintomas severos da doença: obstrução dos tratos gastrintestinal e respiratório, geralmente levando a uma infecção bacteriana das vias aéreas e morte devido à insuficiência respiratória, antes dos 30 anos. Na FC, a camada fina de muco que cobre as superfícies internas dos pulmões está espessa, obstruindo o fluxo de ar e proporcionando um refúgio para bactérias patogênicas, particularmente *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

O gene defeituoso em pacientes com FC foi descoberto em 1989. Ele codifica a proteína de membrana chamada de regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR, de *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Essa proteína possui dois segmentos, cada um contendo seis hélices transmembrana, dois domínios de ligação a nucleotídeos (NBDs) e uma região regulatória (Figura Q-1). O CFTR é, portanto, muito semelhante a outras proteínas transportadoras ABC, exceto que funciona como um *canal iônico* (para o íon $Cl^-$), não como uma bomba.

O canal conduz $Cl^-$ através da membrana plasmática quando ambos NBDs tiverem ligado o ATP, e fecha quando o ATP em um dos NBDs for hidrolisado a ADP e $P_i$. O canal de $Cl^-$ é posteriormente regulado pela fosforilação de vários resíduos de Ser no domínio regulatório, catalisado pela proteíno-cinase dependente de cAMP (Capítulo 12). Quando o domínio regulatório não é fosforilado, o canal de $Cl^-$ está fechado. A mutação responsável pela FC em 70% dos casos resulta em deleção do resíduo de Phe na posição 508. A proteína resultante dobra incorretamente, o que interfere com sua inserção na membrana plasmática, resultando em um movimento reduzido de $Cl^-$ e $H_2O$ através da membrana plasmática de células epiteliais que revestem as vias aéreas (Figura Q-2) e o trato digestório, assim como glândulas exócrinas (pâncreas, glândulas sudoríparas, ductos biliares e canais deferentes).

**FIGURA Q-2** O muco na superfície dos pulmões aprisiona as bactérias. Em pulmões sadios (mostrado aqui), estas bactérias são mortas e varridas para fora pela ação dos cílios. Na FC, este mecanismo está prejudicado, resultando em infecções recorrentes e lesão progressiva dos pulmões.

A secreção líquida é essencial para manter o muco na superfície dos alvéolos pulmonares na viscosidade exata para capturar e eliminar microrganimos que são inalados.

A exportação diminuída de $Cl^-$ é acompanhada pela exportação diminuída de água das células, tornando o muco desidratado, espesso e excessivamente pegajoso na superfície das células. Em circunstâncias normais, os cílios das células epiteliais que revestem a superfície interna dos pulmões removem constantemente as bactérias que se instalam nesse muco, mas o muco espesso em indivíduos com FC impede esse processo. Isso acarreta infecções frequentes por bactérias como *S. aureus* e *P. aeruginosa*, causando um dano progressivo aos pulmões e eficiência respiratória reduzida. Insuficiência respiratória é comumente a causa de morte em pessoas com FC.

**FIGURA Q-1** Três estados do regulador de condutância transmembrana da fibrose cística, CFTR. A proteína tem dois segmentos, cada qual com seis hélices transmembrana, e três domínios funcionalmente significativos se estendem a partir da superfície citoplasmática: $NBD_1$ e $NBD_2$ (em verde) são domínios de ligação nucleotídica que ligam ATP, e um domínio regulatório R (em azul) é o sítio de fosforilação pela proteína-cinase dependente de cAMP. Quando esse domínio R é fosforilado, mas o ATP não se liga aos NBD (esquerda), o canal está fechado. A ligação do ATP abre o canal (centro) até que o ATP ligado seja hidrolisado. Quando o domínio regulatório está desfosforilado (direita), ele se liga ao domínio NBD e impede a ligação de ATP e a abertura do canal. A mutação que mais comumente ocorre levando à FC é a deleção da $Phe^{508}$ no domínio $NBD_1$ (esquerda). O CFTR é um transportador ABC típico em tudo, exceto em dois aspectos: a maioria dos transportadores ABC não possui domínio regulatório, e o CFTR atua como um canal iônico (para $Cl^-$), não como um transportador típico.

**TABELA 11-4** Sistemas de cotransporte movidos por gradientes de $Na^+$ ou $H^+$

| Organismo/tecido/ tipo celular | Soluto transportado (movendo-se contra seu gradiente) | Soluto cotransportado (movendo-se a favor de seu gradiente | Tipo de transporte |
|---|---|---|---|
| *E. Coli* | Lactose<br>Prolina<br>Ácidos dicar-boxílicos | $H^+$<br>$H^+$<br>$H^+$ | Simporte<br>Simporte<br>Simporte |
| Intestino, rim (vertebrados) | Glicose<br>Aminoácidos | $Na^+$<br>$Na^+$ | Simporte<br>Simporte |
| Células de verte-brados (muitos tipos) | $Ca^{2+}$ | $Na^+$ | Antiporte |
| Plantas supe-riores | $K^+$ | $H^+$ | Antiporte |
| Fungos (*Neurospora*) | $K^+$ | $H^+$ | Antiporte |

O **transportador de lactose** (**lactose-permease** ou **galactosídeo-permease**) da *E. coli* é o protótipo bem estudado de cotransportadores impulsionados por prótons. Essa proteína consiste em uma cadeia polipeptídica única (417 resíduos) que funciona como um monômero, transportando um próton e uma molécula de lactose para a célula, com acúmulo resultante de lactose (**Figura 11-41**). A *E. coli* normalmente produz um gradiente de prótons e cargas através da membrana plasmática pela oxidação de combustíveis e uso da energia de oxidação para bombear prótons para fora. (Esse mecanismo é discutido em detalhe no Capítulo 19.) A bicamada lipídica é impermeável a prótons, mas o transportador de lactose provê um caminho para a reentrada dos prótons, e a lactose é simultaneamente carregada para dentro da célula por simporte. O acúmulo endergônico de lactose é, portanto, acoplado ao fluxo exergônico de prótons para dentro da célula, com variação de energia livre total negativa.

O transportador de lactose é um membro da **superfamília facilitadora principal** (**SFP**) de transportadores, que compreende 28 famílias. Quase todas as proteínas nessa superfamília têm 12 domínios transmembrana (algumas poucas exceções têm 14). As proteínas compartilham relativamente pouca homologia de sequência, mas a semelhança entre as suas estruturas secundárias e a topologia sugere uma estrutura terciária comum. A resolução cristalográfica do transportador de lactose da *E. coli* dá uma ideia dessa estrutura geral (**Figura 11-42a**). A proteína tem 12 hélices transmembrana, e alças de conexão projetam-se para o citoplasma ou para o espaço periplasmático (entre a membrana plasmática e a membrana externa ou parede celular). As seis hélices aminoterminais e as seis carboxiterminais formam domínios muito semelhantes, para produzir uma estrutura com simetria aproximadamente dupla. Na forma cristalizada da proteína, uma grande cavidade aquosa é exposta no lado citoplasmático da membrana. O sítio de ligação do substrato encontra-se na cavidade, mais ou menos no centro da membrana. O lado do transportador voltado para fora (face periplasmática) é firmemente fechado, e nenhum canal é grande o suficiente para permitir a entrada de lactose. O mecanismo proposto para a passagem transmembrana do substrato (Figura 11-42b) envolve um movimento oscilatório entre os dois domínios, impulsionado pela ligação do substrato e pelo movimento dos prótons, expondo o domínio de ligação ao substrato alternativamente ao citoplasma e ao periplasma. Esse modelo de "banana oscilante" é semelhante ao mostrado na Figura 11-32 para o GLUT1.

Como o movimento de prótons para dentro da célula está acoplado à captação de lactose? Estudos genéticos extensos do transportador de lactose estabeleceram que,

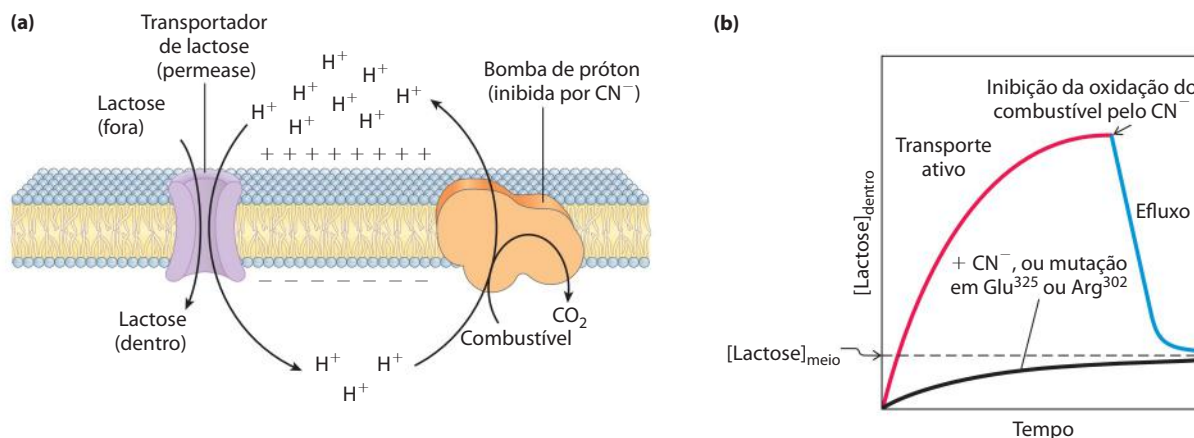



**FIGURA 11-41** **Captação de lactose na *E. coli*.** **(a)** O transporte primário de $H^+$ para fora da célula, impulsionado pela oxidação de uma grande variedade de combustíveis, estabelece tanto um gradiente de prótons quanto um gradiente elétrico (negativo dentro) através da membrana. O transporte ativo secundário de lactose para dentro da célula envolve o simporte de $H^+$ e de lactose pelo transportador de lactose. A captação de lactose contra o seu gradiente é completamente dependente desse influxo de prótons impulsionado pelo gradiente eletroquímico. **(b)** Quando as reações metabólicas de oxidação produtoras de energia são bloqueadas pelo cianeto ($CN^-$), o transportador de lactose permite o equilíbrio de lactose através da membrana via transporte passivo. Mutações que afetam o $Glu^{325}$ ou a $Arg^{302}$ apresentam o mesmo efeito que o cianeto. A linha pontilhada representa a concentração de lactose no meio circundante.

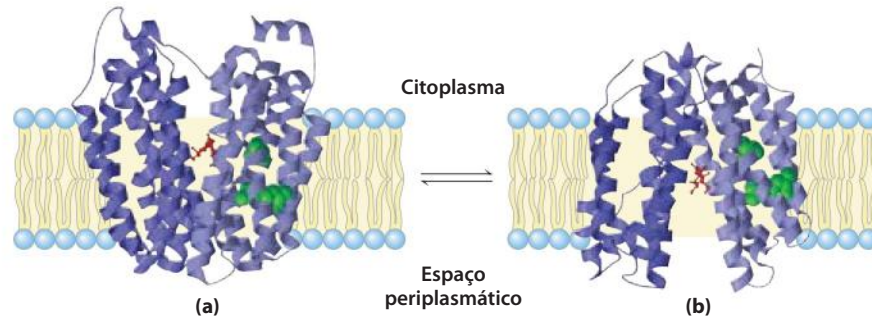
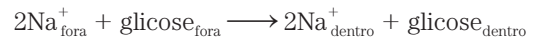



**FIGURA 11-42 O transportador de lactose (lactose-permease) da *E. coli*. (a)** Representação em forma de fita em uma visão paralela ao plano da membrana que mostra as 12 hélices transmembrana dispostas em dois domínios aproximadamente simétricos, em diferentes tons de roxo. Na forma da proteína para a qual a estrutura cristalina foi determinada, o substrato açúcar (em vermelho) está ligado próximo ao centro da membrana onde o açúcar está exposto ao citoplasma (derivado do PDB ID 1PV7). **(b)** A segunda conformação postulada do transportador (PDB ID 2CEQ), relacionada à primeira por uma mudança conformacional grande e reversível na qual o sítio de ligação do substrato é exposto primeiro ao periplasma, de onde a lactose é captada, e então ao citoplasma, para onde a lactose é liberada. A interconversão entre as duas formas é conduzida por mudanças no pareamento de cadeias laterais carregadas (protonáveis) como as do $Glu^{325}$ e da $Arg^{302}$ (em verde), o que é afetado pelo gradiente de prótons transmembrana.

dos 417 resíduos da proteína, apenas 6 eram absolutamente essenciais para o cotransporte de $H^+$ e lactose – alguns para a ligação da lactose, outros para o transporte do próton. A mutação em qualquer um dos dois resíduos ($Glu^{325}$ e $Arg^{302}$; Figura 11-42) resulta em uma proteína ainda capaz de catalisar a difusão facilitada da lactose, mas incapaz de acoplar o fluxo de $H^+$ ao transporte de lactose "morro acima". Um efeito semelhante é observado em células do tipo selvagem (não mutadas) quando sua capacidade de gerar um gradiente de prótons é bloqueada com $CN^-$: o transportador faz difusão facilitada normalmente, mas não consegue bombear lactose contra o gradiente de concentração (Figura 11-41b). O equilíbrio entre as duas conformações do transportador de lactose é afetado por mudanças no pareamento de carga entre as cadeias laterais de $Glu^{325}$ e $Arg^{302}$.

Em células epiteliais do intestino, a glicose e certos aminoácidos são acumulados por simporte com $Na^+$, a favor do gradiente de $Na^+$ estabelecido pela $Na^+K^+$-ATPase da membrana plasmática (**Figura 11-43**). A superfície apical da célula epitelial intestinal é coberta com microvilosidades, projeções finas e longas da membrana plasmática que aumentam muito a área da superfície exposta ao conteúdo intestinal. **Simportadores $Na^+$-glicose** na membrana plasmática apical captam a glicose do intestino em um processo impulsionado pelo fluxo "morro abaixo" do $Na^+$:

$$2Na^+_{fora} + glicose_{fora} \longrightarrow 2Na^+_{dentro} + glicose_{dentro}$$

A energia requerida para esse processo se origina de duas fontes: a concentração de $Na^+$ maior fora do que dentro (o potencial químico), e o potencial de membrana (elétrico) que é negativo dentro e, portanto, atrai $Na^+$ para dentro.

**PROBLEMA RESOLVIDO 11-3 Energética do bombeamento pelo simporte**

Calcule a razão máxima entre $[glicose]_{dentro}/[glicose]_{fora}$ que pode ser conseguida pelo simportador de $Na^+$-glicose da membrana plasmática de uma célula epitelial, quando $[Na^+]_{dentro}$ é 12 mM, a $[Na^+]_{fora}$ é 145 mM, o potencial de membrana é −50 mV (negativo dentro) e a temperatura é 37ºC.

**Solução:** Usando a Equação 11-4 (p. 412), podemos calcular a energia inerente ao gradiente eletroquímico de $Na^+$ – isto é, o custo para deslocar um íon $Na^+$ contra o seu gradiente:

$$\Delta G_t = RT \ln \frac{[Na^+]_{fora}}{[Na^+]_{dentro}} + Z\mathcal{J}\Delta\psi$$

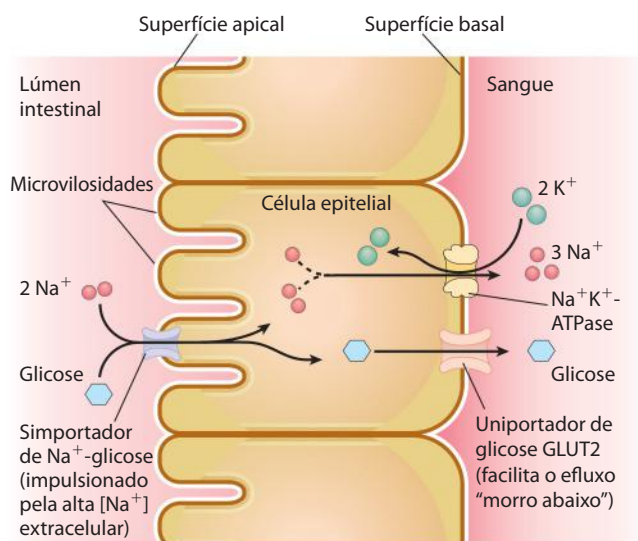
Substitui-se então os valores-padrão de $R$, $T$ e $\mathcal{J}$; os valores dados de $[Na^+]$ (expressos em concentração molar), +1 para $Z$ (porque o $Na^+$ tem carga positiva), e 0,050 V para $\Delta\psi$. Observe que o potencial de membrana é −50 mV (negativo dentro), e isso significa que, quando o íon se desloca de dentro para fora, a mudança no potencial é 50 mV.



**FIGURA 11-43 Transporte de glicose em células epiteliais do intestino.** A glicose é cotransportada com $Na^+$ para dentro da célula epitelial através da membrana plasmática apical. Ela se desloca ao longo da célula para a superfície basal, onde passa para o sangue via GLUT2, um uniportador passivo de glicose. A $Na^+K^+$-ATPase continua a bombear $Na^+$ para fora para manter o gradiente de $Na^+$ que impulsiona a captação de glicose.

$$\Delta G_t = (8{,}315 \text{ J/mol·K})(310 \text{ K}) \ln \frac{1{,}45 \times 10^{-1}}{1{,}2 \times 10^{-2}} + 1(96.500 \text{ J/V·mol})(0{,}050 \text{ V})$$
$$= 11{,}2 \text{ kJ/mol}$$

Quando o $Na^+$ entra novamente na célula, ele libera o potencial eletroquímico criado ao bombeá-lo para fora; o $\Delta G$ para reentrada é $-11{,}2$ kJ/mol de $Na^+$.

Essa é a energia potencial por mol de $Na^+$ que está disponível para bombear a glicose. Dado que dois íons $Na^+$ se deslocam para o interior da célula a favor de seus gradientes eletroquímicos para cada glicose transportada por simporte, a energia disponível para bombear 1 mol de glicose é $2 \times 11{,}2$ kJ/mol $= 22{,}4$ kJ/mol. Agora é possível calcular a razão de concentração máxima de glicose que pode ser obtida por essa bomba (a partir da Equação 11-3, p. 411):

$$\Delta G_t = RT \ln \frac{[\text{glucose}]_{\text{dentro}}}{[\text{glucose}]_{\text{fora}}}$$

Rearranjando, e substituindo-se os valores de $\Delta G_t$, $R$ e $T$, obtém-se

$$\ln \frac{[\text{glicose}]_{\text{dentro}}}{[\text{glicose}]_{\text{fora}}} = \frac{\Delta G_t}{RT} = \frac{22{,}4 \text{ kJ/mol}}{(8{,}315 \text{ J/mol·K})(310 \text{ K})} = 8{,}69$$
$$\frac{[\text{glicose}]_{\text{dentro}}}{[\text{glicose}]_{\text{fora}}} = e^{8{,}69}$$
$$= 5{,}94 \times 10^3$$

Assim, o cotransportador pode bombear glicose para dentro até que sua concentração no interior da célula epitelial seja aproximadamente 6.000 vezes maior do que fora (no intestino). (Essa é uma razão teórica máxima, supondo um acoplamento perfeitamente eficiente de reentrada de $Na^+$ e de captação de glicose.)

À medida que a glicose é bombeada do intestino para a célula epitelial na superfície apical, ela é simultaneamente transferida da célula para o sangue por transporte passivo por meio do transportador de glicose (GLUT2) na superfície basal (Figura 11-43). O papel crucial do $Na^+$ nos sistemas de simporte e antiporte como aqui citado requer um bombeamento constante de $Na^+$ para fora para manter o gradiente de $Na^+$ transmembrana.

Devido ao papel essencial dos gradientes iônicos no transporte ativo e na conservação de energia, compostos que colapsam gradientes iônicos através da membrana são venenos efetivos, e aqueles específicos para microrganismos infecciosos podem servir como antibióticos. Uma substância desse tipo é a valinomicina, um pequeno peptídeo cíclico que neutraliza a carga do $K^+$ ao circundá-lo com seis oxigênios carbonílicos (**Figura 11-44**). O peptídeo hidrofóbico age então como lançadeira, carregando o $K^+$ a favor de seu gradiente de concentração e reduzindo aquele gradiente. Compostos que lançam íons através da membrana dessa forma são chamados de **ionóforos** (transportadores de íons). Tanto a valinomicina quanto a monensina (um ionóforo carregador de $Na^+$) são antibióticos; eles matam células microbianas por desacoplar o processo de transporte ativo secundário das reações de conservação de energia. A monensina é amplamente utilizada como agente antifúngico e antiparasitário. ■

**FIGURA 11-44 Valinomicina, peptídeo ionóforo que liga $K^+$.** Nessa imagem, o contorno da superfície aparece como um envelope amarelo, através do qual estão visíveis uma estrutura em bastões do peptídeo e um íon de $K^+$ (em verde). Os átomos de oxigênio (em vermelho) que ligam $K^+$ fazem parte de uma cavidade hidrofílica central. Cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos (em amarelo) cobrem o lado de fora da molécula. Como o exterior do complexo $K^+$-valinomicina é hidrofóbico, o complexo prontamente difunde-se através da membrana, carregando o $K^+$ a favor de seu gradiente de concentração. A dissipação do gradiente iônico transmembrana resultante mata as células microbianas, fazendo com que a valinomicina seja um antibiótico potente.

## As aquaporinas formam canais hidrofílicos transmembrana para a passagem de água

Peter Agre

Uma família de proteínas integrais de membrana descoberta por Peter Agre, as **aquaporinas** (**AQP**) provêm canais para movimentos rápidos de moléculas de água através de todas as membranas plasmáticas. Aquaporinas são encontradas em todos os organismos, e múltiplos genes de aquaporinas estão geralmente presentes, codificando proteínas similares, mas não idênticas. Onze aquaporinas são conhecidas em mamíferos, cada uma com papel e localização específicos (Tabela 11-5). Os eritrócitos, que incham e murcham rapidamente em resposta a mudanças abruptas na osmolaridade extracelular à medida que o sangue passa pela medula renal, possuem uma alta densidade de aquaporinas em sua membrana plasmática ($2 \times 10^5$ cópias de AQP1 por célula). A secreção de água pelas glândulas exócrinas que produzem suor, saliva e lágrimas ocorre por meio das aquaporinas. Sete aquaporinas diferentes exercem funções na produção de urina e na retenção de água no néfron (a unidade funcional do rim). Cada AQP renal tem uma localização específica no néfron, e cada uma tem propriedades e características regulatórias específicas. Por exemplo, a AQP2 nas células epiteliais dos ductos coletores renais é regulada pela vasopressina (também chamada de hormônio antidiurético): mais água é reabsorvida

**TABELA 11-5** Características de permeabilidade e distribuição predominante de aquaporinas conhecidas de mamíferos

| Aquaporina | Permeante (permeabilidade) | Distribuição no tecido | Distribuição subcelular* |
|---|---|---|---|
| AQP0 | Água (baixa) | Cristalino | Membrana plasmática |
| AQP1 | Água (alta) | Eritrócito, rim, pulmão, endotélio vascular, cérebro, olhos | Membrana plasmática |
| AQP2 | Água (alta) | Rim, vaso deferente | Membrana plasmática apical, vesículas intracelulares |
| AQP3 | Água (alta), glicerol (alta), ureia (moderada) | Rim, pele, pulmão, olhos, colo | Membrana plasmática basolateral |
| AQP4 | Água (alta) | Cérebro, músculo, rim, pulmão, estômago, intestino delgado | Membrana plasmática basolateral |
| AQP5 | Água (alta) | Glândula salivar, glândula lacrimal, glândula sudorípara, pulmão, córnea | Membrana plasmática apical |
| AQP6 | Água (baixa), ânions ($NO_3^- > Cl^-$) | Rim | Vesículas intracelulares |
| AQP7 | Água (alta), glicerol (alta), ureia (alta) | Tecido adiposo, rim, testículo | Membrana plasmática |
| AQP8† | Água (alta) | Testículo, rim, fígado, pâncreas, intestino delgado, colo | Membrana plasmática, vesículas intracelulares |
| AQP9 | Água (baixa), glicerol (alta), ureia (alta), arsenito | Fígado, leucócito, cérebro, testículo | Membrana plasmática |
| AQP10 | Água (baixa), glicerol (alta), ureia (alta) | Intestino delgado | Vesículas intracelulares |

**Fonte:** Dados extraídos de King, L.S., Kozono, D., & Agre, P. (2004). From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **5**, 688.
* Aquaporinas presentes principalmente na membrana apical ou basolateral estão indicadas como localizadas em uma dessas membranas; aquelas presentes em ambas as membranas são descritas como localizadas na membrana plasmática.
† AQP8 também poderia ser permeada pela ureia.

no rim quando os níveis de vasopressina estiverem altos. Camundongos mutantes sem o gene da AQP1 apresentam uma eliminação urinária aumentada (poliúria) e uma capacidade reduzida em concentrar a urina, resultado da permeabilidade diminuída à água no túbulo proximal. Em humanos, as AQP com defeitos genéticos são conhecidas por serem responsáveis por uma grande variedade de doenças, incluindo uma forma relativamente rara de diabetes que é acompanhada por poliúria (Quadro 11-1).

Moléculas de água fluem por um canal de AQP1 a uma taxa aproximada de $10^9$ $s^{-1}$. Para comparação, o mais alto número de renovação para uma enzima é o da catalase, $4 \times 10^7$ $s^{-1}$, e muitas enzimas têm números de renovação entre 1 $s^{-1}$ e $10^4$ $s^{-1}$ (ver Tabela 6-7). A baixa energia de ativação para a passagem de água pelos canais de aquaporina ($\Delta G^{\ddagger}$ < 15 kJ/mol) sugere que a água desloca-se pelos canais em um fluxo contínuo, no sentido definido pelo gradiente osmótico. (Para uma discussão sobre osmose, ver p. 56.) As aquaporinas não permitem a passagem de prótons (íons hidrônio, $H_3O^+$), que poderiam colapsar os gradientes eletroquímicos da membrana. Qual é a base dessa seletividade extraordinária?

Encontra-se essa resposta na estrutura da AQP1, determinada por cristalografia por raios X. A AQP1 (**Figura 11-45a**) consiste em quatro monômeros idênticos (cada um com $M_r$ = 28.000), e cada um deles forma um poro transmembrana com um diâmetro suficiente para permitir a passagem de moléculas de água em fila única. Cada monômero tem seis segmentos helicoidais transmembrana e duas hélices menores, ambas contendo a sequência Asn-Pro-Ala (NPA). As seis hélices transmembrana formam um poro ao longo do monômero, e duas alças curtas contendo as sequências NPA se estendem, a partir de lados opostos, para o centro da bicamada. Suas regiões NPA se sobrepõem no centro da membrana para formar parte do filtro de especificidade – a estrutura que permite que apenas a água o atravesse (Figura 11-45b).

O canal de água se estreita até um diâmetro de 2,8 Å próximo ao centro da membrana, restringindo severamente o tamanho das moléculas que podem passar por ali. A carga positiva de um resíduo de Arg altamente conservado nesse afunilamento impede a passagem de cátions como o $H_3O^+$. Os resíduos que revestem o canal de cada monômero de AQP1 geralmente são apolares, mas oxigênios carbonílicos no esqueleto do peptídeo, projetando-se para a parte estreita do canal em intervalos, podem fazer ligações de hidrogênio com moléculas de água individuais à medida que atravessam o canal; os dois resíduos de Asn ($Asn^{76}$ e $Asn^{192}$) nas alças NPA também formam ligações de hidrogênio com a água. A estrutura do canal não possibilita a formação de uma cadeia de moléculas de água próxima o suficiente para permitir o salto de prótons (ver Figura 2-14), que poderia efetivamente movimentar prótons através da membrana. Resíduos críticos de Arg e His e dipolos elétricos formados pelas hélices curtas das alças NPA provêm cargas positivas que repelem quaisquer prótons que poderiam vazar pelo poro, impedindo ligações de hidrogênio entre moléculas de água adjacentes.

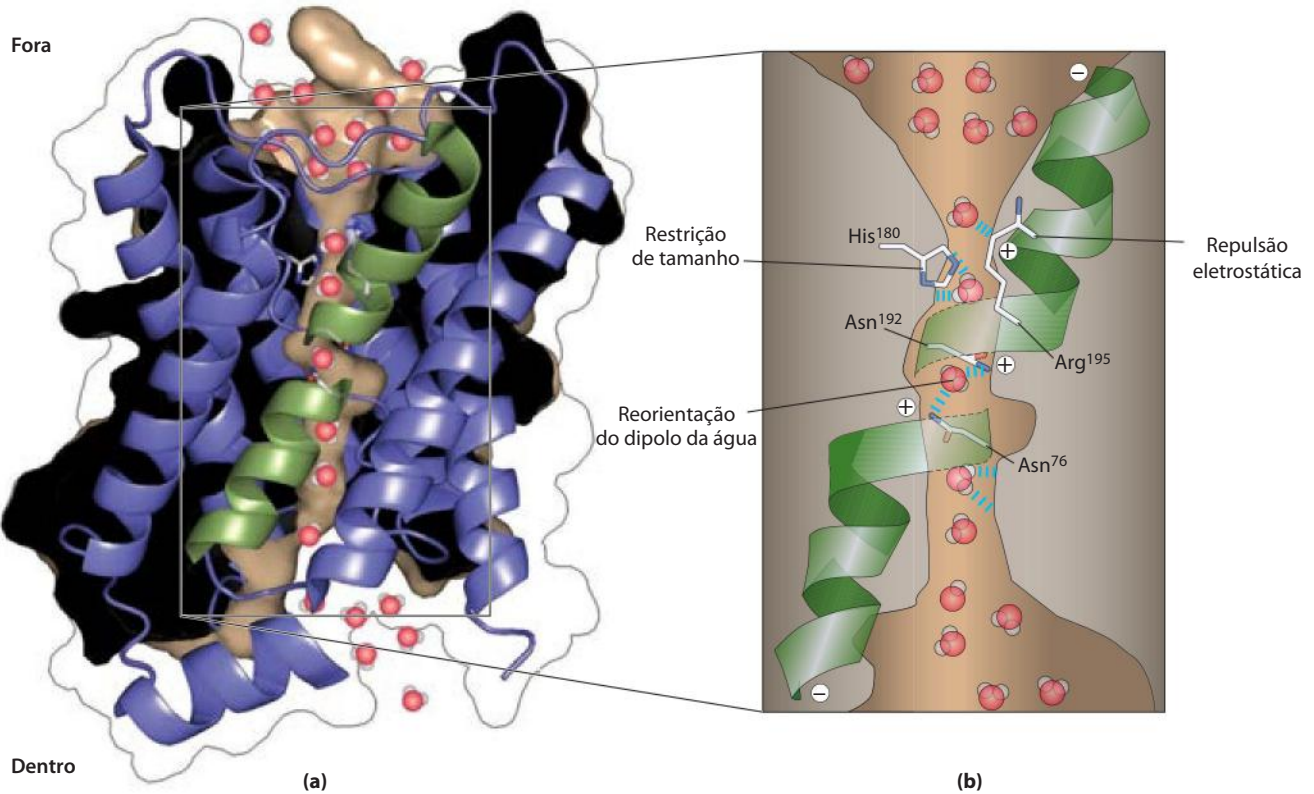



**FIGURA 11-45 Aquaporina.** A proteína é um tetrâmero de subunidades idênticas, cada qual com um poro transmembrana. **(a)** Um monômero da aquaporina de espinafre SoPIP2;1 (derivado do PDB ID 2B5F), visto no plano da membrana. As hélices formam um poro central, e dois segmentos helicoidais curtos (em verde) contêm as sequências Asn-Pro-Ala (NPA), encontradas em todas as aquaporinas que formam parte do canal de água. **(b)** Esse desenho de aquaporina 1 bovina (derivado do PDB ID 1J4N) mostra que o poro (em marrom; preenchido com moléculas de água mostradas em vermelho e branco) se estreita em $His^{180}$ para um diâmetro de 2,8 Å (aproximadamente o tamanho da molécula de água), limitando a passagem de moléculas maiores do que $H_2O$. A carga positiva de $Arg^{195}$ repele cátions, incluindo o $H_3O^+$, impedindo sua passagem pelo poro. As duas hélices curtas mostradas em verde estão orientadas com seus dipolos carregados positivamente apontando para o poro, de forma a forçar a molécula de água a se reorientar à medida que o atravessa; isso quebra as cadeias de ligações de hidrogênio nas moléculas de água, impedindo a passagem de prótons pelo "salto de prótons".

Uma aquaporina isolada de espinafre é conhecida como "portão" – aberto quando dois resíduos de Ser críticos próximos à extremidade intracelular do canal são fosforilados, e fechado quando são desfosforilados. Ambas as estruturas aberta e fechada foram determinadas por cristalografia. A fosforilação favorece a conformação que pressiona dois resíduos de Leu próximos e um resíduo de His para o interior do canal, bloqueando o movimento de água além daquele ponto e efetivamente fechando o canal. Outras aquaporinas são reguladas de outras formas, permitindo mudanças rápidas na permeabilidade da membrana à água.

Embora em geral altamente específicas para a água, algumas AQP também permitem a passagem de glicerol ou ureia em altas taxas (Tabela 11-5); acredita-se que essas AQP sejam importantes no metabolismo do glicerol. A AQP7, por exemplo, encontrada em membranas plasmáticas de adipócitos (células de gordura), transportam glicerol de maneira eficiente. Camundongos com AQP7 defeituosa desenvolvem obesidade e diabetes não dependente de insulina, presumivelmente como resultado de sua incapacidade de deslocar o glicerol para dentro ou para fora dos adipócitos à medida que os triacilgliceróis são convertidos em ácidos graxos livres e glicerol, e que o glicerol é acilado a triacilglicerol.

## Canais iônicos seletivos permitem o movimento rápido de íons através das membranas

**Canais iônicos seletivos** – primeiramente reconhecidos em neurônios, estando também presentes na membrana plasmática de todas as células, assim como nas membranas intracelulares em eucariotos – proporcionam outro mecanismo para deslocar íons inorgânicos através da membrana. Canais iônicos, junto com as bombas iônicas como a $Na^+K^+$-ATPase, determinam a permeabilidade da membrana plasmática a íons específicos e regulam a concentração citosólica de íons e o potencial de membrana. Em neurônios, mudanças muito rápidas na atividade dos canais iônicos causam mudanças no potencial de membrana (potenciais de ação) que carregam sinais de uma extremidade do neurônio para a outra. Em miócitos, a abertura rápida de canais de $Ca^{2+}$ no retículo sarcoplasmático libera o $Ca^{2+}$ que desencadeia a contração muscular. As funções de sinalização de canais iônicos serão abordadas no Capítulo 12. Aqui será descrita a base estrutural para a função do canal iônico, usando exemplos como o canal de $K^+$ controlado por voltagem, o canal de $Na^+$ neuronal e o canal iônico receptor de acetilcolina.

Canais iônicos são distintos de transportadores iônicos em pelo menos três aspectos. Primeiro, a velocidade de fluxo pelos canais pode ser várias ordens de magnitude maior do que o número de renovação para o transportador – $10^7$ a $10^8$ íons/s para um canal iônico, aproximando-se do máximo teórico para difusão irrestrita. Em contrapartida, a velocidade de renovação da $Na^+K^+$-ATPase é de aproximadamente 100 $s^{-1}$. Segundo, canais iônicos não são saturáveis: as velocidades não se aproximam de um máximo em concentração alta de substrato. Terceiro, eles são abertos em resposta a algum evento celular. Em **canais controlados por ligante** (geralmente oligoméricos), a ligação de uma pequena molécula extracelular ou intracelular força uma transição alostérica na proteína, que abre ou fecha o canal. Em **canais iônicos controlados por voltagem**, uma mudança no potencial elétrico transmembrana ($V_m$) causa uma movimentação no domínio da proteína carregada em relação à membrana, abrindo ou fechando o canal. Ambos os tipos de controles, ou portões, podem ser muito rápidos. Um canal geralmente se abre em uma fração de milissegundo e pode permanecer aberto durante apenas milissegundos, tornando esses dispositivos moleculares efetivos para a transmissão muito rápida de sinal no sistema nervoso.

## A função do canal iônico é medida eletricamente

Como um único canal iônico permanece aberto durante apenas alguns poucos milissegundos, monitorar esse processo está além do limite da maioria das medidas bioquímicas. Portanto, fluxos iônicos devem ser medidos eletricamente, tanto como variações em $V_m$ (na faixa de milivolt) quanto como corrente elétrica (na faixa de microampère ou picoampère) usando-se microeletrodos e amplificadores apropriados. Na técnica de **fixação de membrana** (*patch-clamping*) desenvolvida por Erwin Neher e Bert Sakmann em 1976, correntes muito pequenas são medidas através de uma região muito pequena da superfície da membrana contendo apenas uma ou poucas moléculas de canais iônicos (**Figura 11-46**). O pesquisador pode medir a intensidade e a duração da corrente que flui durante uma abertura do canal iônico e pode determinar o quão frequente o canal se abre e como essa frequência pode ser afetada por potencial de membrana, ligantes regulatórios, toxinas e outros agentes. Estudos de fixação de membrana mostraram que uma quantia de $10^4$ íons pode se deslocar por um único canal iônico em 1 ms. Tal fluxo iônico representa uma amplificação imensa do sinal inicial; por exemplo, apenas duas moléculas de acetilcolina são necessárias para abrir o canal receptor (como descrito a seguir).

Erwin Neher

Bert Sakmann

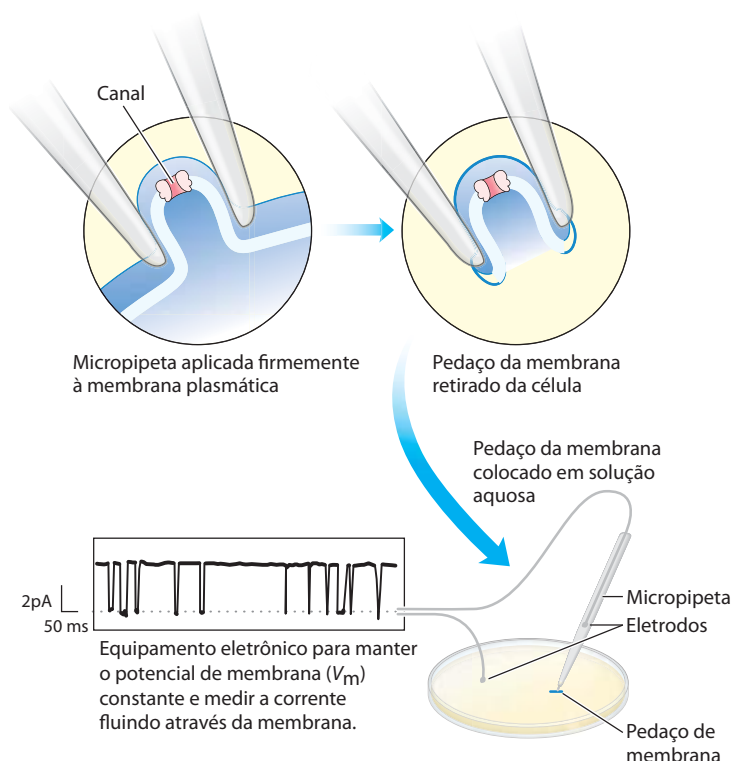



**FIGURA 11-46 Medida elétrica da função do canal iônico.** A "atividade" de um canal iônico é estimada por meio uma medida do fluxo de íons através do canal, usando-se a técnica de fixação de membrana. Uma micropipeta é pressionada contra a superfície celular, e uma pressão negativa aplicada na pipeta forma um selamento por pressão entre a pipeta e a membrana. À medida que a pipeta é puxada da célula, ela puxa também um pedaço muito pequeno da membrana (que pode conter um ou poucos canais iônicos). Depois de colocar o pedaço da membrana mantido pela pipeta em solução aquosa, o pesquisador pode medir a atividade do canal na forma de corrente elétrica que flui entre o conteúdo da pipeta e a solução aquosa. Na prática, um circuito é montado de forma a "fixar" o potencial transmembrana em um determinado valor, e então se mede a corrente que deve fluir para manter essa voltagem. Com detectores de corrente altamente sensíveis, os pesquisadores podem medir a corrente que flui por um único canal iônico, geralmente de poucos picoampéres. O traçado mostra a corrente através de um único canal receptor de acetilcolina em função do tempo (em milissegundos), revelando o quão rápido o canal abre e fecha, o quão frequentemente ele se abre, e por quanto tempo permanece aberto. Deflexão para baixo representa abertura do canal. Fixar o $V_m$ em valores diferentes permite determinar o efeito do potencial de membrana sobre esses parâmetros da função do canal.

## A estrutura do canal de $K^+$ revela a base de sua especificidade

Roderick MacKinnon

A estrutura do canal de potássio da bactéria *Streptomyces lividans*, determinada cristalograficamente por Roderick Mackinnon em 1998, fornece informações importantes sobre como os canais iônicos funcionam. A sequência desse canal iônico de bactéria está relacionada com a de todos os outros canais de potássio conhecidos e serve como protótipo para tais canais, incluindo o canal de $K^+$ controlado por voltagem de neurônios. Entre os membros dessa família de proteínas, as semelhanças nas sequências são maiores na "região do poro", que contém o filtro de seletividade iônica que permite ao $K^+$ (raio de 1,33 Å) atravessar $10^4$ vezes mais prontamente do que o $Na^+$ (raio de 0,95 Å) – a uma velocidade que se aproxima do limite teórico para difusão livre (em torno de $10^8$ íons/s).

O canal de $K^+$ consiste em quatro subunidades idênticas que atravessam a membrana e formam um cone dentro de um cone que circunda o canal iônico, com a porção larga final do cone duplo voltada para o lado extracelular (**Figura 11-47a**). Cada subunidade tem duas hélices $\alpha$ transmembrana, assim como uma terceira hélice mais curta que contribui para a região do poro. O cone externo é formado por uma das hélices transmembrana de cada subunidade. O cone interno, formado pelas outras quatro hélices transmembrana, circunda o canal iônico e cria o filtro de seletividade iônica. Visto de forma perpendicular ao plano da membrana, visualiza-se o canal central como amplo o suficiente para acomodar um íon metálico não hidratado como o potássio (Figura 11-47b).

Tanto a especificidade iônica quanto o alto fluxo através do canal são compreendidos a partir do que conhecemos da estrutura do canal (Figura 11-47c). Nas superfícies interna e externa da membrana plasmática, a entrada para o canal tem vários resíduos de aminoácidos carregados negativamente, que talvez aumentem a concentração local de cátions como $K^+$ e $Na^+$. O caminho iônico através da membrana inicia (na superfície interna) como um canal largo preenchido com água no qual o íon retém a sua esfera de hidratação. A estabilização posterior é fornecida pelas hélices curtas na região do poro de cada subunidade, com as cargas negativas parciais de seus dipolos elétricos apontando para o $K^+$ no canal. Em cerca de dois terços desse caminho através da membrana, esse canal estreita-se na região do filtro de seletividade, forçando o íon a abandonar suas moléculas de água de hidratação. Átomos de oxigênio carbonílicos no esqueleto do filtro de seletividade substituem as moléculas de água na esfera de hidratação, formando uma série perfeita de camadas de coordenação pela qual o $K^+$ se move. Essa interação favorável com o filtro não é possível para o $Na^+$, já que ele é muito pequeno para fazer contato com todos os possíveis ligantes de oxigênio. A estabilização preferencial de $K^+$ é a base para a seletividade do filtro, e mutações que alteram os resíduos nessa parte da proteína eliminam a seletividade iônica do canal. Os sítios de ligação ao $K^+$ do filtro são flexíveis o suficiente para colapsar

**FIGURA 11-47** **O canal de $K^+$ de *Streptomyces lividans*.** (PDB ID 1BL8) **(a)** Visto do plano da membrana, o canal consiste em oito hélices transmembrana (duas de cada uma das quatro subunidades idênticas), formando um cone com sua parte final larga voltada para o espaço extracelular. As hélices internas do cone (com coloração mais suave) revestem o canal transmembrana, e as hélices externas interagem com a bicamada lipídica. Segmentos curtos de cada subunidade convergem na porção final aberta do cone para formar um filtro de seletividade. **(b)** Nesta visão, perpendicular ao plano da membrana, aparecem as quatro subunidades dispostas ao redor de um canal central largo o suficiente para um único íon $K^+$ passar. **(c)** Diagrama de um canal de $K^+$ em secção transversal, mostrando as características estruturais críticas para a função. Os oxigênios carbonílicos (em vermelho) no filtro de seletividade do esqueleto do peptídeo projetam-se para o canal, interagindo e estabilizando o íon $K^+$ que passa por ali. Esses ligantes estão perfeitamente posicionados para interagirem com cada um dos cada quatro íons de $K^+$, mas não com os íons menores de $Na^+$. Essa interação preferencial com o $K^+$ é a base da seletividade iônica.

de forma a acomodar qualquer $Na^+$ que entre no canal, e essa mudança conformacional fecha o canal.

Há quatro sítios possíveis de ligação ao $K^+$ ao longo do filtro de seletividade, cada um composto por uma "gaiola" de oxigênio que provê os ligantes para os íons $K^+$ (Figura 11-47c). Na estrutura cristalina, dois íons $K^+$ são visíveis dentro do filtro de seletividade, distantes um do outro em cerca de 7,5 Å, e duas moléculas de água ocupam as posições não preenchidas. Íons $K^+$ passam pelo filtro em fila única; a repulsão eletrostática mútua entre eles provavelmente equilibra a interação de cada íon com o filtro de seletividade e os mantém em movimento. O movimento de dois íons $K^+$ é combinado: primeiro eles ocupam as posições 1 e 3, e depois saltam para as posições 2 e 4. A diferença energética entre essas duas configurações (1, 3 e 2, 4) é muito pequena; energeticamente, o poro de seletividade não é uma série de morros e vales, mas uma superfície plana, que é ideal para o movimento rápido do íon através do canal. A estrutura do canal parece ter sido otimizada durante a evolução para proporcionar velocidades máximas de fluxo e alta especificidade.

Canais de $K^+$ controlados por voltagem são estruturas mais complexas do que aquela ilustrada na Figura 11-47, mas são variações do mesmo tema. Por exemplo, os canais de $K^+$ controlados por voltagem da família *Shaker* em mamíferos possuem um canal iônico semelhante ao canal bacteriano mostrado na Figura 11-47, mas com um domínio proteico adicional sensível ao potencial de membrana, que se move em resposta à mudança de potencial e, ao se mover, desencadeia a abertura ou o fechamento do canal de $K^+$ (**Figura 11-48**). A hélice transmembrana crítica no domí-

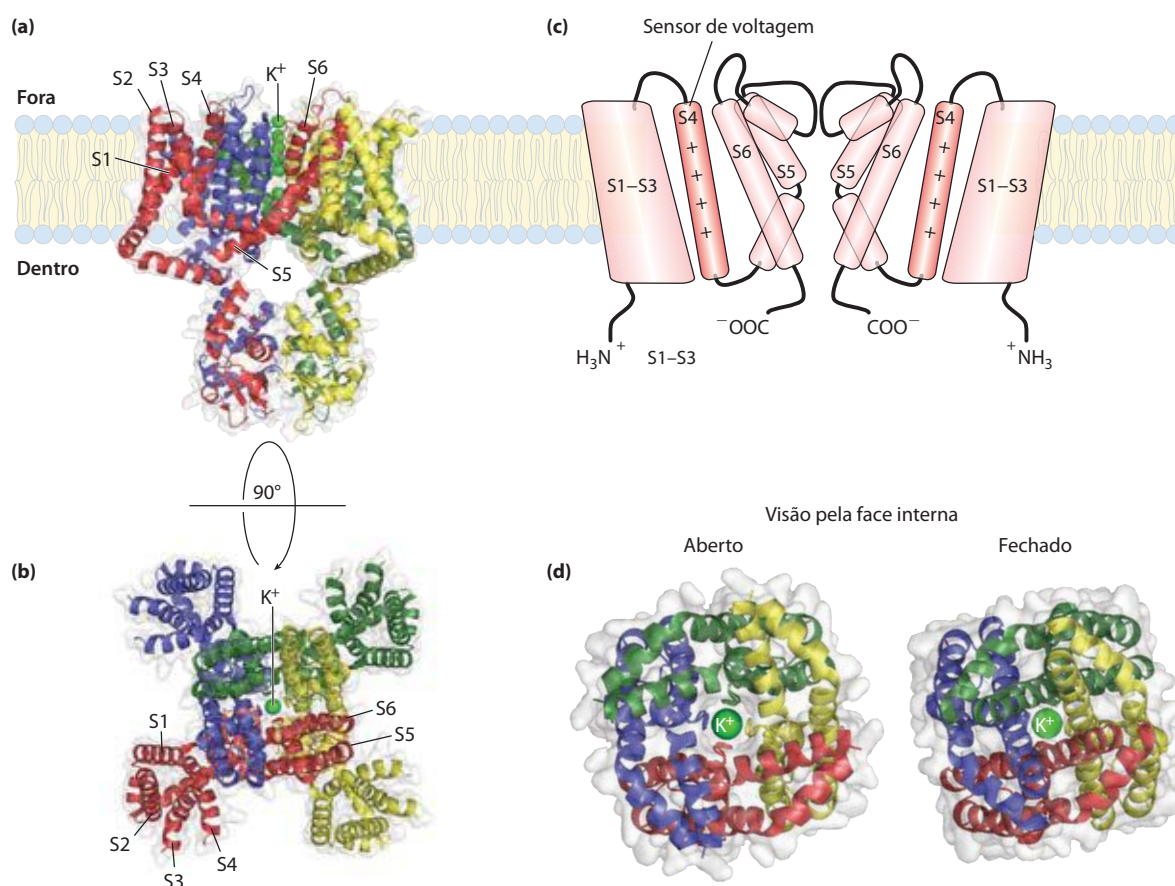



**FIGURA 11-48 Base estrutural para a abertura controlada por voltagem no canal de $K^+$.** (PDB ID 2A79) Essa estrutura cristalina do complexo da subunidade Kv1.2-$\beta$2 do cérebro de rato mostra o canal de $K^+$ básico (conforme o mostrado na Figura 11-47) com a maquinaria extra necessária para tornar o canal sensível para abrir de acordo com o potencial de membrana: quatro extensões helicoidais transmembrana de cada subunidade e quatro subunidades $\beta$. O complexo inteiro visto **(a)** no plano da membrana e **(b)** perpendicular ao plano (observado de fora da membrana) é representado como na Figura 11-47, com cada subunidade em uma cor diferente; cada uma das quatro subunidades é colorida com a mesma cor da subunidade com a qual se associa. Em (b), cada hélice transmembrana de uma subunidade (em vermelho) é numerada, de S1 a S6. S5 e S6 de cada uma das quatro subunidades formam o canal propriamente dito e são comparáveis às duas hélices transmembrana de cada subunidade na Figura 11-47. S1 a S4 são quatro hélices transmembrana. A hélice S4 contém os resíduos de Arg altamente conservados, e se acredita que seja a parte principal que se movimenta no mecanismo sensível à voltagem. **(c)** Um diagrama esquemático do canal controlado por voltagem, mostrando a estrutura básica do poro (centro) e as estruturas extras que tornam o canal sensível à voltagem; a hélice S4 que contém os resíduos de Arg, está em cor de laranja. Para maior clareza, as subunidades $\beta$ não são mostradas nesta visualização. Na membrana em repouso, o potencial elétrico transmembrana (negativo dentro) exerce uma atração sobre as cadeias laterais das Arg carregadas positivamente em S4, em direção ao lado citosólico. Quando a membrana é despolarizada, a atração é reduzida e, com a reversão completa do potencial de membrana, S4 é empurrado em direção ao lado extracelular. **(d)** Esse movimento de S4 está fisicamente acoplado à abertura e ao fechamento do canal de $K^+$, que está mostrado aqui em suas conformações aberta e fechada. Embora o $K^+$ esteja presente no canal fechado, o poro fecha na base, próximo ao citosol, impedindo a passagem de $K^+$.

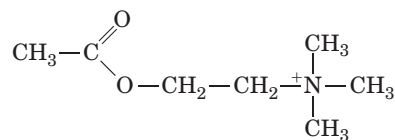
nio sensível à voltagem dos canais de $K^+$ de *Shaker* contém quatro resíduos de Arg; as cargas positivas nesses resíduos fazem com que a hélice se mova em relação à membrana em resposta a mudanças no campo elétrico transmembrana (o potencial de membrana).

As células também têm canais que conduzem especificamente $Na^+$ ou $Ca^{2+}$ e excluem $K^+$. Em cada caso, a capacidade de diferenciar cátions requer tanto uma cavidade no sítio de ligação somente com o tamanho correto (nem muito grande nem muito pequena) para acomodar o íon, quanto o posicionamento preciso dentro da cavidade dos oxigênios carbonílicos que podem substituir a camada de hidratação dos íons. Esse ajuste pode ser conseguido com moléculas menores do que proteínas; por exemplo, a valinomicina (Figura 11-44) pode prover o encaixe preciso que dá alta especificidade para a ligação de um íon em vez de outro. Os químicos têm projetado moléculas pequenas com especificidade muito alta para a ligação de $Li^+$ (raio de 0,60 Å), $Na^+$ (raio de 0,95 Å), $K^+$ (raio de 1,33 Å), ou $Rb^+$ (raio de 1,48 Å). As versões biológicas, entretanto – as proteínas de canais – não apenas *ligam* especificamente, mas conduzem íons através de membranas de uma forma *controlada*.

## Canais iônicos dependentes de portão são fundamentais na função neuronal

Praticamente toda a sinalização rápida entre neurônios e seus tecidos-alvo (como o músculo) é mediada pela abertura e o fechamento rápido de canais iônicos nas membranas plasmáticas. Por exemplo, canais de $Na^+$ em membranas plasmáticas neuronais percebem o gradiente elétrico transmembrana e respondem a mudanças por abertura ou fechamento. Esses canais iônicos controlados por voltagem são geralmente muito seletivos para o $Na^+$ em relação a outros cátions mono ou divalentes (por um fator de 100 ou mais) e têm velocidades de fluxo muito altas ($>10^7$ íons/s). Fechados no estado de repouso, os canais de $Na^+$ são abertos – ativados – pela redução do potencial de membrana; eles sofrem então uma inativação muito rápida. Alguns milissegundos após a abertura, um canal fecha e permanece inativo por vários milissegundos. A ativação seguida pela inativação é a base da sinalização neuronal (ver Figura 12-26).

Outro canal iônico muito bem estudado é o **receptor nicotínico da acetilcolina**, que atua na passagem de um sinal elétrico de um neurônio motor para uma fibra muscular na junção neuromuscular (sinalizando para o músculo contrair). A acetilcolina liberada pelo neurônio motor difunde-se alguns poucos micrômetros para a membrana plasmática do miócito, onde se liga a um receptor de acetilcolina. Isso força uma mudança conformacional no receptor, causando a abertura de seu canal iônico. O movimento resultante de íons carregados positivamente para dentro do miócito despolariza a membrana plasmática e desencadeia a contração. O receptor da acetilcolina permite ao $Na^+$, ao $Ca^{2+}$ e ao $K^+$ atravessarem o canal com a mesma facilidade, porém outros cátions e todos os ânions são incapazes de passar. O movimento de $Na^+$ através do canal iônico receptor da acetilcolina é insaturável (sua velocidade é linear em relação à $[Na^+]$ extracelular) e muito rápido – aproximadamente $2 \times 10^7$ íons/s em condições fisiológicas.

$$CH_3-C(=O)-O-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3$$

Acetilcolina

O canal receptor para a acetilcolina é típico entre muitos outros canais iônicos que produzem ou respondem a sinais elétricos: ele tem um "portão", que abre em resposta à estimulação por uma molécula sinalizadora, e um mecanismo temporizador intrínseco, que fecha o portão após uma fração de segundo. Assim, o sinal da acetilcolina é transitório – característica essencial para a condução elétrica do sinal.

Com base em semelhanças entre as sequências de aminoácidos de outros canais iônicos controlados por ligante e o receptor da acetilcolina, canais receptores neuronais que respondem às moléculas sinalizadoras extracelulares ácido γ-aminobutírico (GABA), glicina e serotonina são agrupados na superfamília do receptor da acetilcolina e provavelmente compartilham a estrutura tridimensional e os mecanismos de portão. Os receptores $GABA_A$ e da glicina são canais aniônicos específicos para ânions $Cl^-$ ou $HCO_3^-$, ao passo que o receptor da serotonina, assim como o receptor da acetilcolina, é cátion-específico.

Outra classe de canais iônicos controlados por ligante responde a ligantes *intracelulares*: 3´,5´-mononucleotídeo de guanosina cíclico (cGMP) no olho de vertebrado, cGMP e cAMP em neurônios olfatórios, e ATP e inositol 1,4,5-trifosfato ($IP_3$) em muitos tipos celulares. Esses canais são compostos por subunidades múltiplas, cada uma com seis domínios helicoidais transmembrana. As funções de sinalização desses canais iônicos serão discutidas no Capítulo 12.

A Tabela 11-6 mostra alguns transportadores discutidos em outros capítulos no contexto das vias onde atuam.

## Canais iônicos defeituosos podem ter consequências fisiológicas graves

A importância de canais iônicos em processos fisiológicos é claramente evidenciada a partir de efeitos de mutações em proteínas de canais iônicos específicos (Tabela 11-7, Quadro 11-2). Defeitos genéticos em canais de $Na^+$ controlados por voltagem da membrana plasmática de miócito resultam em doenças em que os músculos são periodicamente paralisados (como na paralisia periódica hipercalêmica) ou enrijecidos (como na paramiotonia congênita). A fibrose cística é o resultado de uma mutação que altera um aminoácido na proteína CFTR, um canal iônico de $Cl^-$; o processo defeituoso, aqui, não está na neurotransmissão, mas na secreção de varias células glandulares exócrinas com atividades vinculadas ao fluxo de íons $Cl^-$.

Muitas toxinas que ocorrem naturalmente atuam em canais iônicos, e a potência dessas toxinas ilustra a importância da função do canal iônico normal. A tetrodotoxina (produzida pelo baiacu, *Sphaeroides rubripes*) e a saxitoxina (produzida pelo dinoflagelado *Gonyaulax*, que causa as "marés vermelhas") atuam ligando-se aos canais de $Na^+$ com abertura de portão controlada por voltagem em neurônios, impedindo os potenciais de ação normais. O baiacu é

**TABELA 11-6** Sistemas de transporte descritos em outros locais deste texto

| Sistema de transporte e local | Figura | Função |
|---|---|---|
| Antiportador do nucleotídeo adenina na membrana interna mitocondrial | 19-30 | Importa ADP substrato para a fosforilação oxidativa e exporta ATP produto |
| Receptor/canal de acetilcolina | 12-28 | Sinaliza contração muscular |
| Transportador de acil-carnitina/carnitina na membrana mitocondrial interna | 17-6 | Importa ácidos graxos para a matriz para oxidação $\beta$ |
| Simportador de $P_i$-$H^+$ na membrana mitocondrial interna | 19-30 | Fornece $P_i$ para a fosforilação oxidativa |
| Transportador do malato-$\alpha$-cetoglutarato na membrana mitocondrial interna | 19-31 | Inicia o transporte de equivalentes redutores (como malato) da matriz para o citosol |
| Transportador glutamato-aspartato da membrana mitocondrial interna | 19-31 | Completa o transporte iniciado pela lançadeira malato-$\alpha$--cetoglutarato |
| Transportador de citrato na membrana mitocondrial interna | 21-10 | Provê citrato citosólico como fonte de acetil-CoA para síntese de lipídeos |
| Transportador de piruvato na membrana mitocondrial interna | 21-10 | É parte do mecanismo de transporte do citrato da matriz para o citosol |
| Transportador de ácidos graxos na membrana plasmática de miócito | 17-3 | Importa ácidos graxos para combustível |
| Transportadores de prótons dos complexos I, III e IV na membrana mitocondrial interna | 19-16 | Atuam como mecanismos de conservação de energia na fosforilação oxidativa, convertendo fluxo de elétrons em gradiente de prótons |
| Termogenina (proteína 1 desacopladora), um poro de prótons na membrana mitocondrial interna | 19-36, 23-34 | Permite a dissipação do gradiente de prótons na mitocôndria como forma de termogênese e/ou eliminação de excesso de combustível |
| Complexo citocromo *bf*, um transportador de próton da membrana tilacoide do cloroplasto | 19-61 | Atua como bomba de prótons, movida pelo fluxo de elétrons pelo esquema Z; fonte de gradiente de prótons para a síntese de ATP na fotossíntese |
| Bacteriorrodopsina, uma bomba de prótons impulsionada pela luz | 19-69 | É uma fonte de gradiente de prótons impulsionada pela luz, para a síntese de ATP em bactérias halofílicas |
| ATPase $F_oF_1$ / ATP-sintase na membrana mitocondrial interna, tilacoide do cloroplasto e membrana plasmática bacteriana | 19-25<br>19-62a<br>19-66 | Interconversão de energia do gradiente de prótons e do ATP durante a fosforilação oxidativa e fotofosforilação |
| Antiportador $P_i$-triose-fosfato na membrana interna de cloroplasto | 20-15<br>20-16 | Exporta produto fotossintético do estroma; importa $P_i$ para a síntese de ATP |
| Transportador de proteína bacteriana | 27-44 | Exporta proteínas secretadas através da membrana plasmática |
| Trasladase proteica do RE | 27-38 | Transporta proteínas para o RE com destino à membrana plasmática, secreção ou organelas |
| Trasladase proteica no poro nuclear | 27-42 | Permuta proteínas entre o núcleo e o citoplasma |
| Receptor LDL em membrana plasmática celular animal | 21-41 | Importa, por endocitose mediada por receptor, partículas que carregam lipídeo |
| Transportador de glicose de membrana plasmática da célula animal; regulado pela insulina | 12-16 | Aumenta a capacidade do tecido muscular e adiposo na captação de excesso de glicose a partir do sangue |
| Canal de $Ca^{2+}$ controlado por $IP_3$ no RE | 12-10 | Permite a sinalização via alteração de [$Ca^{2+}$ ] citosólico |
| Canal de $Ca^{2+}$ controlado por cGMP dos cones e bastonetes da retina | 12-37 | Permite a sinalização via rodopsina ligada a fosfodiesterase dependente de cAMP em olho de vertebrados |
| Canal de $Na^+$ controlado por voltagem | 12-26 | Cria potenciais de ação na transmissão neuronal de sinal |

**TABELA 11-7** Algumas doenças resultantes de defeitos em canais iônicos

| Canal iônico | Gene afetado | Doença |
|---|---|---|
| $Na^+$ (portão controlado por voltagem, músculo esquelético) | *SCN4A* | Paralisia periódica hipercalêmica (ou paramiotonia congênita) |
| $Na^+$ (portão controlado por voltagem, neuronal) | *SCN1A* | Epilepsia generalizada com convulsões febris |
| $Na^+$ (portão controlado por voltagem, músculo cardíaco) | *SCN5A* | Síndrome 3 do QT longo |
| $Ca^{2+}$ (neuronal) | *CACNA1A* | Enxaqueca hemiplégica familiar |
| $Ca^{2+}$ (portão controlado por voltagem, retina) | *CACNA1F* | Cegueira noturna estacionária congênita |
| $Ca^{2+}$ (policistina-1) | *PKD1* | Doença renal policística |
| $K^+$ (neuronal) | *KCNQ4* | Surdez dominante |
| $K^+$ (portão controlado por voltagem, neuronal) | *KCNQ2* | Convulsões neonatais familiares benignas |
| Cátion não específico (portão controlado por cGMP, retinal) | *CNCG1* | Retinite pigmentosa |
| Receptor de acetilcolina (músculo esquelético) | *CHRNA1* | Síndrome miastênica congênita |
| $Cl^-$ | *CFTR* | Fibrose cística |

um ingrediente da iguaria japonesa fugu, que pode ser preparada apenas por cozinheiros especialmente treinados para separar o petisco suculento do veneno mortal. Ingerir um marisco que tenha se alimentado de *Gonyaulax* também pode ser fatal; os mariscos não são sensíveis à saxitoxina, mas ela se concentra em seus músculos, o que os torna altamente venenosos a organismos mais elevados na cadeia alimentar. O veneno da serpente mamba preta contém dendrotoxina, que interfere com os canais de $K^+$ controlados por voltagem. A tubocurarina, o componente ativo do curare (usado como veneno em flechas na região amazônica), e duas outras toxinas de venenos de serpentes, a cobrotoxina e a bungarotoxina, bloqueiam o receptor da acetilcolina ou impedem a abertura de seu canal iônico. Todas essas toxinas causam paralisia e, possivelmente, a morte, pelo bloqueio de sinais dos nervos para os músculos. Olhando pelo lado otimista, a afinidade extremamente alta da bungarotoxina pelo receptor da acetilcolina ($K_d = 10^{-15}$ M) tem se mostrado útil experimentalmente: a toxina radiomarcada foi usada para quantificar o receptor durante sua purificação. ■

## RESUMO 11.3 Transporte de solutos através da membrana

- O movimento de compostos polares e de íons através de membranas biológicas requer proteínas transportadoras. Alguns transportadores simplesmente facilitam a difusão passiva através da membrana a partir de um lado com concentração mais alta para o lado com concentração mais baixa. Outros transportam solutos contra o gradiente eletroquímico; isso requer uma fonte de energia metabólica.
- Os carreadores, da mesma forma que as enzimas, apresentam saturação e estereoespecificidade para seus substratos. O transporte via tais sistemas pode ser passivo ou ativo. O transporte ativo primário é movido por ATP ou por reações de transferência de elétrons; o transporte ativo secundário é movido pelo fluxo acoplado de dois solutos, um dos quais (geralmente $H^+$ ou $Na^+$) flui a favor de seu gradiente eletroquímico enquanto o outro é levado contra o seu gradiente.
- Os transportadores GLUT, como o GLUT1 de eritrócitos, carregam glicose para as células por difusão facilitada. Esses transportadores são uniportadores, carregando apenas um substrato. Simportadores permitem a passagem simultânea de duas substâncias no mesmo sentido. Exemplos: o transportador de lactose da *E. coli*, movido pela energia de um gradiente de prótons (simporte lactose-$H^+$), e o transportador de glicose das células epiteliais no intestino, impulsionado pelo gradiente de $Na^+$ (simporte glicose-$Na^+$). Antiportadores controlam a passagem simultânea de duas substâncias em sentidos opostos; exemplos são o trocador de cloreto-bicarbonato em eritrócitos e a $Na^+K^+$-ATPase ubíqua.
- Em células animais, a $Na^+K^+$-ATPase mantém as diferenças nas concentrações extracelular e citosólica de $Na^+$ e $K^+$, e o gradiente resultante de $Na^+$ é usado como fonte de energia para uma variedade de processos de transporte ativo secundário.
- A $Na^+K^+$-ATPase da membrana plasmática e os transportadores de $Ca^{2+}$ dos retículos sarcoplasmático e endoplasmático (as bombas SERCA) são exemplos de ATPases do tipo P; elas sofrem fosforilação reversível durante o seu ciclo catalítico. Bombas de próton ATPases do tipo F (ATP-sintases) são fundamentais nos mecanismos de conservação de energia em mitocôndrias e cloroplastos. ATPases do tipo V produzem gradientes de prótons através de algumas membranas intracelulares, incluindo membranas vacuolares de plantas.
- Transportadores ABC carregam uma grande variedade de substratos (incluindo muitos fármacos) para fora das células, usando ATP como fonte de energia.
- Ionóforos são moléculas solúveis em lipídeos que ligam íons específicos e os carregam passivamente através de

membranas, dissipando a energia dos gradientes eletroquímicos.

- A água atravessa a membrana pelas aquaporinas. Algumas aquaporinas são reguladas; algumas também transportam glicerol ou ureia.
- Canais iônicos provêm poros hidrofílicos pelos quais íons selecionados podem se difundir, diminuindo seus gradientes elétricos ou químicos; eles têm a característica de serem insaturáveis, têm velocidades de fluxo muito altas, e são altamente específicos para um determinado íon. A maioria funciona com portão controlado por voltagem ou ligante. O canal de $Na^+$ neuronal é controlado por voltagem, e o canal iônico receptor de acetilcolina é controlado por esse neurotransmissor, o qual desencadeia mudanças conformacionais que abrem e fecham o caminho transmembrana.

## Termos-chave

*Os termos em negrito estão definidos no glossário.*



## Leituras adicionais

### Composição e arquitetura de membranas

**Dowhan, W.** (1997) Molecular basis for membrane phospholipids diversity: why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem* **66**, 199-232.

**Ediden, M.** (2002) Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 414-418.
Pequena revisão de como a noção da bicamada lipídica da membrana foi desenvolvida e confirmada.

**Leventis, P.A. & Grinstein, S.** (2010) The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu. Rev. Biophys*. **39**, 407-427.

**Maxfield, R.R. & van Meer, G.** (2010). Cholesterol, the central lipid of mammalian cells *Curr. Opin. Cell. Biol.* **22**, 422-429.

**Von Heijne, G.** (2006) Membrane protein topology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 909-918.

**White, S.H., Ladokhin, A.S., Jayasinghe, S., & Hristova, K.** (2001) How membranes shape protein structure. *J. Biol. Chem.* **276**, 32.395-32.398.
Breve revisão de nível intermediário sobre as forças que moldam as hélices transmembrana.

**Wimley, W.C.** (2003) The versatile $\beta$ barrel membrane protein. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 1-8.
Revisão de nível intermediário.

**Zeh, K. &Thein, M.** (2010) Porins in prokaryotes and eukaryotes: common themes and variations. *Biochem. J.* 431, 13-22.
Revisão de nível intermediário das porinas barril $\beta$.

### Dinâmica da membrana

**Daleke, D.L.** (2007) Phospholipid flippases. *J. Biol. Chem.* **282**, 821-825.
Revisão de nível intermediário.

**Deveaux, P.F., Lopez-Montero, I., & Bryde, S.** (2006) Proteins involved in lipid translocation in eukaryotic cells. *Chem. Phys. Lipids.* **141**, 119-132.

**Didier, M., Lenne, P.-F., Rigneault, H., & He, H.-T.** (2006) Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *Embo J.* **25**, 3446-3457.
Revisão de nível intermediário sobre estudos de dinâmica de membrana, com sondas fluorescentes e outras sondas.

**Frost, A., Unger, V.M., & De Camilli, P.** (2009) The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules. *Cell* **137**, 191-196.

**Frye, L.D. & Ediden, M.** (1970) The rapid intermixing of cell-surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J. Cell Sci.* **7**, 319-335.
Demonstração clássica da mobilidade das proteínas de membrana.

**Graham, T.R.** (2004) Flippases and vesicle-mediated protein transport. *Trends Cell Biol.* **14**, 670-677.
Revisão de nível intermediário da função da flipase.

**Graham, T.R. & Kozlov, M.M.** (2010) Interplay of proteins and lipids in generating membrane curvature. *Curr. Opin. Cell Biol*. **22**, 430-436.

**Hannich, J.T., Umebayashi, K., & Riezman, H.** (2011) Distribution and function of sterols and sphingolipids. In *The Biology of Lipids: Trafficking, Regulation, and Function* (Simons, K., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; also in *CSH Perspect. Cell Biol*. doi:10.1101/cshperspect.a004762.

**Jahn, R. & Scheller, R.H.** (2006) SNAREs – engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Cell Mol. Biol.* **7**, 631-643.
Excelente revisão de nível intermediário do papel das SNARE na fusão de membrana e do mecanismo de fusão propriamente dito.

**Janmey, P.A. & Kunnunen, P.K.J.** (2006) Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends Cell Biol.* **16**, 538-546.

**Leventis, P.A. & Grinstein, S.** (2010) The distrbution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu. Rev. Biophys*. **39**, 407-427.
Revisão avançada que inclui discussão sobre flipases.

**Lingwood, D. & Simons, K.** (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46-50.

**MacCallum, J.L. & Tieleman, D.P.** (2011) Hydrophobicity scales: a thermodynamic looking glass into lipid-protein interactions. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 653-662.
Revisão de nível intermediário sobre vários métodos de determinação da hidrofobicidade de aminoácidos.

**Marguet, D., Lenne, P.-F., Rigneault, H., & He, H.-T.** (2006) Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *EMBO J.* **25**, 3446-3457.
Revisão de nível intermediário dos métodos e resultados de estudos sobre movimentos moleculares na membrana.

**Martens, S. & McMahon, H.T.** (2008) Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 543-566.

**Niessen, C.M., Leckband, D., & Yap, A.S.** (2011) Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. *Physiol. Rev*. **91**, 691-731.

**Palmgren, M.G. & Nissen, P.** (2011) P-types ATPases. *Annu. Rev. Biophys.* **40**, 243-266.
Revisão avançada de transportadores que incluem flipases do tipo P4.

**Palsdottir, H. & Hunte, C.** (2004) Lipids in membrane protein structures. *Biochim Biophys. Acta* **1666**, 2-18.

**Parton, R.G. & Simons, K.** (2007) The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Cell Mol. Biol.* **8**, 185-194.

**Phillips, R., Ursel, T., Wiggins, P., & Sens, P.** (2009) Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. *Nature* **459**, 379-385.
Revisão de nível intermediário.

**Qualman, B., Koch, D., Kessels, M.M.** (2011) Let´s go bananas: revisiting the endocytic BAR code. *EMBO J* **30**, 3501-3515.
Revisão de nível intermediário sobre a ação dos domínios BAR em causar curvatura na membrana.

**Quinn, P.J. & Wolf, C.** (2009) The liquid ordered phase in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 33-46.
Revisão avançada sobre o estado dos lipídeos de membrana. Essa é uma entre as 26 revisões excelentes que aparecem nessa edição da revista, sobre todos os aspectos do estado dos lipídeos em membranas biológicas.

**Sanyal, S. & Menson, A.K.** (2009) Flipping lipids: why an´ what´s the reason for? *ACS Chem. Biol.* **4**, 895-909.
Revisão de nível intermediário sobre flipases em biogênese da membrana.

**Sezgin, E. & Schwille, P.** (2011) Fluorescence technique to study lipid dynamics. In The Biology of Lipids: Trafficking, Regulation, and Function (Simons, K., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; also in CSH Perspect. Cell Biol. doi:10.1101/cshperspect.a009803.

**Simons, K. & Sampaio, J.L.** (2011) Membrane organization and lipid rafts. In The Biology of Lipids: Trafficking, Regulation, and Function (Simons, K., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; also in CSH Perspect. Cell Biol. doi:10.1101/cshperspect. a004697.

**Tanaka, K., Fujimura-Kamada, K., & Yamamoto, T.** (2011) Functions of phospholipids flippases. *J. Biochem.* **149**, 131-143.
Revisão de nível intermediário sobre a estrutura e função da flipase.

**van der Velden, L.M., van de Graaf, |S.F.J., & Klomp, L.W.J.** (2010) Biochemical and cellular functions of $P_4$ ATPases. *Biochem. J.* **431**, 1-11.
Revisão de nível intermediário sobre as flipases $P_4$ATPase.

**van Deurs, B., Roepstorff, K., Hommelgaard, A.M., & Sandpit, K.** (2003) Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. *Trends Cell Biol.* **13**, 92-100.

**van Meer, G.** (2011) Dynamic transbilayer lipid assymetry. In The Biology of Lipids: Trafficking, Regulation, and Function (Simons, K., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; also in CSH Perspect. Cell Biol. doi:10.1101/cshperspect. a004671.

**Wickner, W. & Shekmana, R.** (2010) Membrane fusion *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 658-664.
Revisão breve e acessível das moléculas envolvidas na fusão de membrana.

**Zhang, Y.-M. & Rock, C.O.** (2008) Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 222-233.

**Zimmerberg, J. & Kozlov, M.M.** (2006) How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat. Rev. Cell Mol. Biol.* **7**, 9-19.

## Transportadores

**Augustin, R.** (2010) The protein family of glucose transport facilitators: it´s not only about glucose after all. *IUBMB Life* 62, 315-333.
Revisão avançada sobre a estrutura e função das proteínas GLUT.

**Brini, M. & Carafoli, E.** (2009) Calcium pumps in health and disease *Physiol. Rev.* **89**, 1341-1378.

**Bublitz, M., Poulson, H., Preben Morth, J., & Nissen, P.** (2010) In and out of the cation pumps: P-type ATPase structure revisited. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20, 431-439.

**Bublitz, M., Preben Morth, J., & Nissen, P.** (2011) P-type ATPases at a glance. *J. Cell Sci.* **124**, 2515-2519.

**Fujiyoshi, Y., Mitsuoka, K., de Groot, B.L., Philippsen, A., Grubmuller, H., Agre, P., & Engel, A.** (2002) Structure and function of water channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 509-515.

**Guan, L. & Kaback, H.R.** (2006) Lessons from lactose permease. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35**, 67-91.

**Hoffman, N.J. & Elmendorf, J.S.** (2011) Signaling, cytoskeletal and membrane mechanisms regulating GLUT4 exocytosis. *Trends Endocrinol. Metab.* **22**, 110-116.

**Jones, P.M., O´Mara, M.L. & George, A.M.** (2001) ABC transporters: a riddle wrapped in a mystery inside an enigma. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 520-531.
Revisão de nível intermediário da estrutura e função do transportador de ATP.

**Kjellbom, P., Larsson, C., Johansson, I., Karlsson, M., & Johanson, U.** (1999) Aquaporins and water homeostasis in plants. *Trends Plant. Sci*. **4**, 308-314.
Revisão de nível intermediário.

**Preben Morth, J., Pedersen, B., Buch-Pedersen, M.J., Andersen, J.P., Vilsen, B., Palmgren, M.G., & Nissen, P.** (2011)

A structural overview of the plasma membrane $Na^+K^+$ATPase and $H^+$-ATPase íon pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 60-70.

**Rees, D.C., Johnson, E., & Lewinson, O.** (2009) ABC transporters: the power to change. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **10**, 218–227.

**Sui, H., Han, B.-G., Lee, J.K. Walian, P., & Jap, B. K.** (2001) Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* **414**, 872-878.

Solução com alta resolução da estrutura da aquaporina por cristalografia por raios X.

**Thorens, B.& Mueckler, M.** (2010) Glucose transporters in the 21st century. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **298**, E141-E145.

Revisão de nível intermediário dos facilitadores de glicose.

**Toyoshima, C. & Mizutani, T.** (2004) Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature* **430**, 529-535.

**Toyoshima, C., Nomura, H., & Tsuda, T.** (2004) Lumenal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogs. *Nature* **432**, 361-368.

Os materiais suplementares disponíveis junto com a versão desse artigo incluem um filme excelente do suposto mecanismo de portão.

**Watson, R.T. & Pessin, J.E.** (2006) Bridging the GAP between insulin signaling and GLUT4 translocation. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 215-222.

Revisão de nível intermediário da regulação do transporte de glicose através do GLUT4.

**Wright, E.M., Loo, D.D.F. & Hirayama, B.A.** (2011) Biology of human sodium glucose transporters. *Physiol. Rev*. 91, 733-794.

Revisão avançada da bioquímica e fisiologia dos cotransportadores de $Na^+$-glicose.

**Zeth, K. & Thein, M.** (2010) Porins in prokaryotes and eukaryotes: common themes and variations. *Biochem. J.* 431, 13-22.

### Canais iônicos

**Ashcroft, F.M.** (2006) From molecule to malady. *Nature* **440**, 440-447.

Pequena revisão de muitos casos conhecidos nos quais os defeitos genéticos em canais iônicos levam a doenças em humanos.

**Doyle, D.A., Cabral, K.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M, Cohen, S.L., Chait, B.T., & MacKinnon, R.** (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of $K^+$ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77.

A primeira estrutura cristalina de um canal iônico é descrita.

**Gadsby, D.C., Vergani, P., &Csanady, L.** (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* **440**, 477-483.

Essa é uma entre as sete excelentes revisões de canais iônicos publicada nessa edição da *Nature*.

**Gouaux, E. & MacKinnon, R.** (2005) Principles of selective íon transport in channels and pumps. *Science* **310,** 1461-1465.

Pequena revisão de características arquitetônicas de canais e bombas que dão a cada proteína a sua especificidade iônica.

**Guggino, W.B. & Stanton, B.A.** (2006) New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 426-436.

**Hille, B.** (2001), *Icn channels of Excitable Membranes*, 3rd edn, Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Texto de nível intermediário enfatizando a função dos canais iônicos.

**Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T., & MacKinnon, R.** (2003) X-ray structure of a voltage-dependent $K^+$ channel. *Nature* **423**, 33-41.

**King, L.S., Kozono, D., & Agre, P.** (2004) From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat. Rev. Cell Mol. Biol.* **5**, 687-698.

Revisão de nível intermediário da localização das aquaporinas nos tecidos de mamíferos e dos impactos dos defeitos das aquaporinas na fisiologia.

**Lee, A.G. & East, J.M.** (2001) What the structure of a calcium pump tell us about its mechanism. *Biochem J.* **356** 665-683.

**Long, S.B., Campbell, E.B., & MacKinnon, R.** (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent *Shaker* family $K^+$ channel *Science*. **309**, 897-902.

**Neher, E. & Sakmann, B.** (1992) The patch clamp technique. *Sci. Am.* (March) **266**, 44-51.

Descrição clara dos métodos eletrofisiológicos usados para medir a atividade de um único canal iônico, pelos vencedores do Prêmio Nobel que desenvolveram essa técnica.

**Tombola, F., Pathak, M.M., & Isacoff, E.Y.** (2006) How does voltage open an íon channel? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 23-52.

Revisão avançada dos mecanismos de portão controlado por voltagem dos canais iônicos.

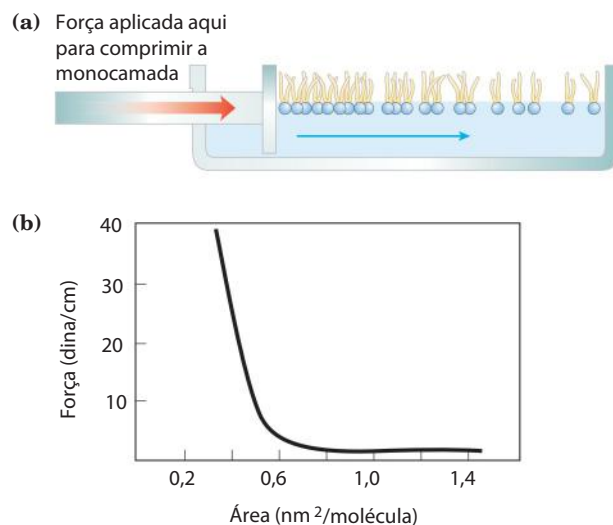
**Verkman, A.S.** (2011) Aquaporins at a glance. *J. Cell Sci.* **124**, 2107-2112.

Revisão de nível intermediário, em estilo pôster, da estrutura e função da aquaporina.

## Problemas

**1. Determinando a área de secção transversal de uma molécula lipídica.** Quando fosfolipídeos são dispostos suavemente na superfície da água, eles se orientam na interface ar-água com seus grupos polares na água e suas caudas hidrofóbicas no ar. Um dispositivo experimental **(a)** foi criado de forma a reduzir a área da superfície disponível para uma camada de lipídeos. Medindo-se a força necessária para agrupar os lipídeos, é possível determinar quando as moléculas estão compactadas firmemente em uma monocamada contínua; ao se aproximar dessa área, a força necessária para uma posterior redução da área da superfície aumenta repentinamente **(b)**. Como você usaria esse dispositivo para determinar a área média ocupada por uma única molécula lipídica na monocamada?

**(a)** Força aplicada aqui para comprimir a monocamada

**(b)**

**2. Evidência de uma bicamada lipídica.** Em 1925, E. Gorter e F. Grendel usaram um dispositivo como o descrito no Problema 1 para determinar a área da superfície de uma monocamada lipídica formada pelos lipídeos extraídos de eritrócitos de várias espécies de animais. Usaram um microscópio para medir as dimensões das células individuais, e a partir daí, calcularam a média da área da superfície de um eritrócito. Obtiveram os dados mostrados na tabela. É justificada a conclusão desses investigadores de que "os cromócitos (eritrócitos) estão cobertos por uma camada de substâncias gordurosas com espessura correspondente a duas moléculas" (ou seja, a bicamada lipídica)?

| Animal | Volume de células empacotadas (mL) | Número de células (por $mm^3$) | Área total da superfície da monocamada lipídica das células ($m^2$) | Área total da superfície de uma célula ($\mu m^2$) |
|---|---|---|---|---|
| Cachorro | 40 | 8.000.000 | 62 | 98 |
| Ovelha | 10 | 9.900.000 | 6,0 | 29,8 |
| Homem | 1 | 4.740.000 | 0,92 | 99,4 |

**Fonte:** Dados obtidos de Gorter, E. & Grendel, F. (1925) On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J. Exp. Med.* **41**, 439-443.

**3. Número de moléculas de detergente por micela.** Quando uma pequena quantidade do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS; $Na^+CH_3(CH_2)_{11}OSO_3^-$) é dissolvida em água, os íons do detergente entram na solução como espécies monoméricas. À medida que mais detergente é adicionado, uma concentração é alcançada (concentração micelar crítica) na qual os monômeros se associam para formarem micelas. A concentração micelar crítica de SDS é 8,2 mM. As micelas têm uma massa média de partícula (a soma das massas moleculares dos monômeros constituintes) de 18.000. Calcule o número de moléculas do detergente na micela média.

**4. Propriedades dos lipídeos e das bicamadas lipídicas.** Bicamadas lipídicas formadas entre duas fases aquosas têm essa propriedade importante: elas formam lâminas bidimensionais, a borda de cada uma se fecha sobre a outra e elas sofrem autosselamento para formar vesículas (lipossomos).

(a) Que propriedades dos lipídeos são responsáveis por essa propriedade das bicamadas? Explique.

(b) Quais são as consequências dessa propriedade para a estrutura de membranas biológicas?

**5. Comprimento da molécula de ácido graxo.** A distância na ligação carbono-carbono para carbonos em ligação simples, como em uma cadeia acil graxa saturada, é de cerca de 1,5 Å. Estime o comprimento de uma única molécula de palmitato na sua forma completamente estendida. Se duas moléculas de palmitato forem colocadas alinhadas e com as extremidades em contato, como o seu comprimento total poderia se comparar com a espessura da bicamada lipídica em uma membrana biológica?

**6. Dependência da temperatura na difusão lateral.** O experimento descrito na Figura 11-18 foi realizado a 37ºC. Se o experimento tivesse ocorrido a 10ºC, que efeito você esperaria na taxa de difusão? Por quê?

**7. Síntese de suco gástrico: energética.** O suco gástrico (pH 1,5) é produzido pelo bombeamento de HCl do plasma sanguíneo (pH 7,4) para o estômago. Calcule a quantidade de energia livre requerida para concentrar o $H^+$ em 1 L de suco gástrico a 37ºC. Nas condições celulares, quantos moles de ATP devem ser hidrolisados para prover essa quantidade de energia livre? A variação na energia livre da hidrólise de ATP em condições celulares é de aproximadamente −58 kJ/mol (como explicado no Capítulo 13). Ignore os efeitos do potencial elétrico transmembrana.

**8. Energética da $Na^+K^+$-ATPase.** Dada uma célula de vertebrado típica com potencial de membrana de −0,070 V (negativo dentro), qual é a variação na energia livre para transportar 1 mol de $Na^+$ da célula para o sangue a 37 ºC? Suponha que a concentração de $Na^+$ dentro da célula seja de 12 mM e que no plasma sanguíneo seja de 145 mM.

**9. Ação da ouabaína no tecido renal.** A ouabaína inibe especificamente a atividade da $Na^+K^+$-ATPase de tecidos animais, mas não se sabe quanto à inibição de qualquer outra enzima. Quando a ouabaína é adicionada a fatias finas de tecido renal vivo, ela inibe o consumo de oxigênio em 66%. Por quê? O que essa observação nos diz sobre o uso de energia respiratória pelo tecido renal?

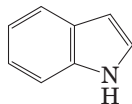
**10. Energética do simporte.** Suponha que você tenha determinado experimentalmente que o sistema de transporte celular para a glicose, conduzido pelo simporte de $Na^+$, possa acumular glicose até atingir concentrações 25 vezes maiores do que aquela do meio externo, quando a $[Na^+]$ externa era apenas 10 vezes maior do que a $[Na^+]$ no meio intracelular. Isso violaria as leis da termodinâmica? Se não, como você explicaria essa observação?

**11. Localização de uma proteína de membrana.** As seguintes observações se referem a uma proteína de membrana desconhecida, X. Ela pode ser extraída a partir da ruptura de membranas de eritrócitos em uma solução salina concentrada, podendo ser hidrolisada em fragmentos por enzimas proteolíticas. O tratamento de eritrócitos com enzimas proteolíticas, seguido pela ruptura e a extração dos componentes da membrana, produz uma X intacta. Entretanto, o tratamento de "fantasmas" de eritrócitos (que consistem em apenas membranas plasmáticas, produzidas pela ruptura de células e a remoção da hemoglobina) com enzimas proteolíticas, seguido pela ruptura e a extração, produz X extensivamente fragmentada. O que essas observações indicam sobre a localização de X na membrana? As propriedades de X se parecem com as das proteínas integrais de membrana ou com as periféricas?

**12. Autosselamento da membrana.** Membranas celulares são autosselantes – se elas forem perfuradas ou rompidas mecanicamente, elas resselam rápida e automaticamente. Que propriedades da membrana são responsáveis por essa característica importante?

**13. Temperatura de fusão de lipídeos.** Lipídeos de membrana em amostras de tecidos obtidos de diferentes partes da perna de um veado apresentam diferentes composições de ácidos graxos. Os lipídeos de membrana de tecido próximo aos cascos contêm uma proporção maior de ácidos graxos insaturados do que aqueles de tecido da parte superior da perna. Qual é o significado dessa observação?

**14. Difusão *flip-flop*.** A lâmina interna (monocamada) da membrana de eritrócito humano consiste predominantemente em fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina. A lâmina externa consiste predominantemente em fosfatidilcolina e esfingomielina. Embora os componentes fosfolipídicos da membrana possam difundir na bicamada fluida, essa lateralidade é sempre preservada. Como?

**15. Permeabilidade da membrana.** Em pH 7, o triptofano atravessa a bicamada lipídica com cerca de um milésimo da taxa do indol, um composto estreitamente relacionado.

Sugira uma explicação para essa observação.

**16. Fluxo de água através de uma aquaporina.** Um eritrócito humano tem aproximadamente $2 \times 10^5$ monômeros de AQP1. Se moléculas de água fluírem através da membrana a uma taxa de $5 \times 10^8$ por tetrâmero de AQP1 por segundo, e o volume de um eritrócito for $5 \times 10^{-11}$ mL, o quão rapidamente poderia um eritrócito reduzir seu volume à metade como encontrado em alta osmolaridade (1 M) no fluido intersticial da medula renal? Suponha que o eritrócito consista unicamente em água.

**17. Marcação do transportador de lactose.** Um transportador bacteriano de lactose, altamente específico para a lactose, contém um resíduo de Cys que é essencial para a sua atividade de transporte. A reação covalente de *N*-etilmaleimida (NEM) com este resíduo de Cys inativa irreversivelmente o transportador. Uma alta concentração de lactose no meio impede a inativação pela NEM, presumivelmente por proteger estericamente o resíduo de Cys, que se encontra no sítio de ligação da lactose ou próximo a ele. Você não sabe mais nada sobre a proteína transportadora. Sugira um experimento que possa permitir a determinação da $M_r$ do polipeptídeo transportador contendo Cys.

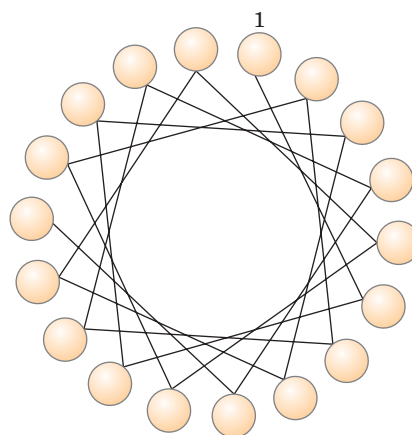
**18. Previsão da topologia da proteína de membrana a partir da sequência.** Você clonou o gene para uma proteína de eritrócito humano, que suspeita ser uma proteína de membrana. A partir da sequência de nucleotídeos do gene, você conhece a sequência de aminoácidos. A partir desta sequência somente, como você avaliaria a possibilidade de que a proteína seja uma proteína integral de membrana? Suponha que a proteína seja uma proteína integral, do tipo I ou II. Sugira experimentos bioquímicos ou químicos que permitiriam determinar qual é o seu tipo.

**19. Captação intestinal de leucina.** Você está estudando a captação de L-leucina pelas células epiteliais do intestino de camundongo. Medidas da taxa de captação de L-leucina e vários de seus análogos, com ou sem $Na^+$ no tampão do ensaio, produzem os resultados dados na tabela. O que você pode concluir sobre as propriedades e o mecanismo do transportador de leucina? Você esperaria que a captação de L-leucina fosse inibida pela ouabaína?

| | Captação na presença de $Na^+$ | | Captação na ausência de $Na^+$ | |
|---|---|---|---|---|
| **Substrato** | $V_{máx}$ | $K_t$ (mM) | $V_{máx}$ | $K_t$ (mM) |
| L-Leucina | 420 | 0,24 | 23 | 0,2 |
| D-Leucina | 310 | 4,7 | 5 | 4,7 |
| L-Valina | 225 | 0,31 | 19 | 0,31 |

**20. Efeito de um ionóforo no transporte ativo.** Considere o transportador de leucina descrito no Problema 19. A $V_{máx}$ e/ou $K_t$ mudaria se você adicionasse um ionóforo de $Na^+$ à solução do ensaio contendo $Na^+$? Explique.

**21. Densidade de superfície de uma proteína de membrana.** A *E. coli* pode ser induzida a produzir aproximadamente 10.000 cópias do transportador de lactose ($M_r$ 31.000) por célula. Considere a *E. coli* como um cilindro de 1 $\mu$m de diâmetro e 2 $\mu$m de comprimento. Que fração da superfície da membrana plasmática é ocupada pelas moléculas transportadoras de lactose? Explique como você chegou a essa conclusão.

**22. Uso do diagrama da roda helicoidal.** Uma roda helicoidal é uma representação em duas dimensões de uma hélice, uma visão ao longo de seu eixo central (ver Figura 11-30b; ver também a Figura 4-4d). Use o diagrama da roda helicoidal mostrado aqui para determinar a distribuição de resíduos de aminoácidos em um segmento de hélice com a sequência -Val--Asp-Arg-Val-Phe-Ser-Asn-Val-Cys-Thr-His-Leu-Lys-Thr-Leu--Gln-Asp-Lys-

O que você pode dizer sobre as propriedades da superfície dessa hélice? Que orientação da hélice você esperaria na estrutura terciária da proteína integral de membrana?

**23. Espécies moleculares na membrana da *E. coli*.** A membrana plasmática da *E. coli* é composta por cerca de 75% de proteína e 25% de fosfolipídeo em relação ao peso. Quantas moléculas de lipídeos de membrana estão presentes para cada molécula de proteína de membrana? Considere uma $M_r$ média de proteína de 50.000 e uma $M_r$ média de fosfolipídeo de 750. O que mais você precisaria saber para estimar a fração da superfície da membrana que é coberta por lipídeos?

## Bioquímica na internet

**24. Topologia das proteínas de membrana.** O receptor para o hormônio epinefrina em células animais é uma proteína integral de membrana ($M_r$ 64.000) que se acredita ter sete regiões que atravessem a membrana.

(a) Mostre que a proteína desse tamanho é capaz de atravessar a membrana sete vezes.

(b) Dada a sequência de aminoácidos da proteína, como você poderia prever quais regiões proteicas formam as hélices que atravessam a membrana?

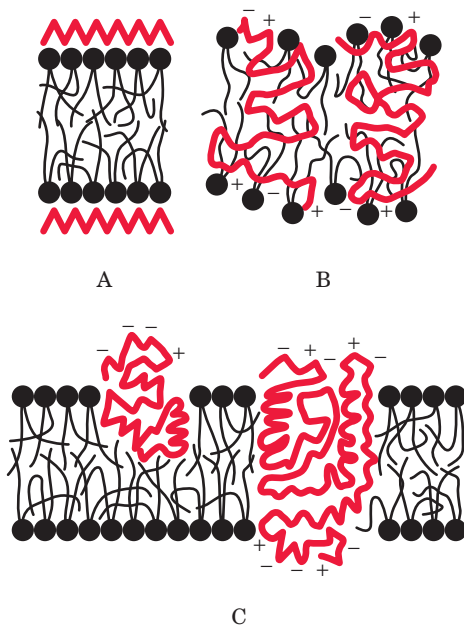
(c) Acesse o Banco de Dados de Proteínas (www.pdb.org). Use o identificador PDB 1DEP para buscar a página de dados para uma porção do receptor $\beta$-adrenérgico (um tipo de receptor para a epinefrina) isolado de peru. Usando Jmol para ex-

plorar a estrutura, preveja se essa porção do receptor está localizada dentro da membrana ou em sua superfície. Explique.

(d) Busque os dados para uma porção de outro receptor, o receptor da acetilcolina em neurônios e miócitos, usando o identificador PDB 1A11. Da mesma forma que em (c), preveja onde esta porção do receptor está localizada e explique sua resposta.

Se você não usou o PDB, ver Quadro 4-4 (p. 132) para mais informações.

## Problema de análise de dados

**25. O modelo do mosaico fluido da estrutura da membrana biológica.** A Figura 11-3 mostra o modelo de mosaico fluido da estrutura da membrana biológica, aceito atualmente. Esse modelo foi apresentado em detalhe em um artigo de revisão por S. J. Singer em 1971. No artigo, Singer apresentou os três modelos da estrutura de membrana que foram propostos naquela época:

A. O Modelo de Davson-Danielli-Robertson. Esse era o modelo mais amplamente aceito em 1971, quando a revisão de Singer foi publicada. Nesse modelo, os fosfolipídeos estão arranjados como uma bicamada. Proteínas são encontradas em ambas as superfícies da bicamada, ligadas a ela por interações iônicas entre grupos polares carregados dos fosfolipídeos e grupos carregados das proteínas. Não há proteínas no interior da bicamada.

B. O Modelo da Subunidade Lipoproteica de Benson. Aqui, as proteínas são globulares, e a membrana é uma mistura de proteína e lipídeo. As caudas hidrofóbicas dos lipídeos estão embebidas nas partes hidrofóbicas das proteínas. Os grupos polares lipídicos estão expostos ao solvente. Não há bicamada lipídica.

C. O Modelo do Mosaico da Proteína Globular-Lipídeo. Esse é o modelo mostrado na Figura 11-3. Os lipídeos formam uma bicamada e as proteínas estão embebidas nela, algumas se estendendo através da bicamada e outras não. As proteínas estão ancoradas na bicamada por interações hidrofóbicas entre as caudas hidrofóbicas dos lipídeos e as porções hidrofóbicas da proteína.

Considerando os dados disponíveis a seguir, considere como cada parte de informação se encaixa com cada um dos três modelos da estrutura da membrana. Qual(is) modelo(s) é(são) mantido(s), quais não são, e que restrições você tem sobre os dados ou suas interpretações? Explique seu raciocínio.

(a) Quando as células foram fixadas, coradas com tetróxido de ósmio e examinadas sob microscopia eletrônica, as membranas mostram uma aparência de "via férrea", com duas linhas escuras separadas por um espaço claro.

(b) O valor encontrado para a espessura das membranas das células fixadas e coradas da mesma forma foi de 5 a 9 nm. A espessura de uma bicamada fosfolipídica "nua", sem proteínas, foi de 4 a 4,5 nm. A espessura de uma única monocamada de proteínas era de cerca de 1 nm.

(c) Singer escreveu em seu artigo: "A composição média de aminoácidos das proteínas de membrana não é distinguível daquela das proteínas solúveis. Em particular, uma fração substancial de resíduos é hidrofóbica" (p. 165).

(d) Como descrito nos Problemas 1 e 2 deste capítulo, pesquisadores extraíram membranas de células, extraíram os lipídeos e compararam a área da monocamada lipídica com a área da membrana da célula original. A interpretação dos resultados tornou-se complicada pela questão ilustrada no gráfico do Problema 1: a área da monocamada dependia da força usada para presssioná-la. Com pressões muito leves, a razão entre a área da monocamada e a área da membrana estava em torno de 2,0. Com pressões mais altas – supostamente como as encontradas em células – a razão era substancialmente mais baixa.

(e) Espectroscopia de dicroísmo circular utiliza mudanças na polarização da luz UV para fazer inferências quanto à estrutura secundária da proteína (ver Figura 4-10). Em média, essa técnica mostrou que as proteínas de membrana têm uma grande quantidade de hélices $\alpha$ e pouca ou nenhuma folha $\beta$. Esse achado foi consistente com a maioria das proteínas de membrana que possuíam estrutura globular.

(f) A fosfolipase C é uma enzima que remove o grupo polar (incluindo o fosfato) de fosfolipídeos. Em vários estudos, o tratamento de membranas intactas com fosfolipase C removeu cerca de 70% dos grupos polares sem interromper a estrutura de "via férrea" da membrana.

(g) Singer descreveu em seu artigo um estudo no qual "a glicoproteína com massa molecular aproximada de 31.000 em membranas de células sanguíneas vermelhas era hidrolisada em glicopeptídeos solúveis com massa molecular aproximada de 10.000, após tratamento tríptico de membranas, enquanto as demais porções eram bastante hidrofóbicas" (p. 199). O tratamento com tripsina não causou mudanças grosseiras nas membranas, que permaneceram intactas.

A revisão de Singer também incluiu muitos outros estudos nessa área. No final, entretanto, os dados disponíveis em 1971 não provavam conclusivamente que o Modelo C estava correto. À medida que mais dados foram se acumulando, esse modelo da estrutura da membrana foi sendo aceito pela comunidade científica.

## Referência

**Singer, S.J.** (1971) The molecular organization of biological membranes. In *Structure and Function of Biological Membranes* (Rothfield, L.I. ed.), pp. 145-222, Academic Press, Inc., New York.

# 12

# Biossinalização



A capacidade das células em receber e responder a sinais para além da membrana plasmática é fundamental à vida. As células bacterianas recebem mensagens constantes de proteínas de membrana que atuam como receptores de informação, monitorando o meio externo em relação a pH, força osmótica, disponibilidade de alimento, oxigênio e luz, e presença de substâncias químicas nocivas, predadores ou competidores por alimento. Esses sinais provocam respostas apropriadas, como o movimento na direção do alimento ou na direção oposta das substâncias tóxicas ou a formação de esporos em um ambiente exaurido de nutrientes. Nos organismos multicelulares, células com diferentes funções trocam vários sinais entre si. As células vegetais respondem a hormônios do crescimento e a variações na luz solar. As células animais trocam informações sobre a concentração de íons e glicose nos fluidos extracelulares, as atividades metabólicas interdependentes que ocorrem em diferentes tecidos e, no embrião, a localização correta das células durante o desenvolvimento. Em todos esses casos, o sinal representa *informações* detectadas por receptores específicos e convertidas em resposta celular, que sempre envolve um processo *químico*. Essa conversão de informação em alteração química, a **transdução de sinal**, é uma propriedade universal das células vivas.

## 12.1 Características gerais da transdução de sinal

Transdutores de sinal são notavelmente específicos e extremamente sensíveis. A **especificidade** é alcançada por uma complementaridade molecular precisa entre as moléculas sinalizadoras e receptoras (**Figura 12-1a**), mediada pelos mesmos tipos de forças fracas (não covalentes) que controlam as interações enzima-substrato e antígeno-anticorpo. Os organismos multicelulares têm um grau de especificidade adicional, porque os receptores de um dado sinal, ou os alvos intracelulares de uma dada rota de sinalização, estão presentes em apenas alguns tipos celulares. O hormônio liberador de tireotropina, por exemplo, desencadeia respostas nas células da adeno-hipófise, mas não nos hepatócitos, que carecem de receptores para esse hormônio. A adrenalina altera o metabolismo do glicogênio nos hepatócitos, mas não nos adipócitos; nesse caso, os dois tipos celulares têm receptores para esse hormônio, porém, enquanto os hepatócitos contêm glicogênio e a enzima que metaboliza o glicogênio, que é controlada pela adrenalina, os adipócitos não contêm nem um nem outro. Os adipócitos respondem à adrenalina liberando ácidos graxos a partir de triacilgliceróis e exportando-os a outros tecidos.

São três os fatores responsáveis pela extraordinária sensibilidade da transdução de sinal: a alta afinidade dos receptores para as moléculas sinalizadoras, a cooperatividade (frequentemente, mas nem sempre) da interação ligante-receptor e a amplificação do sinal por cascatas enzimáticas. A **afinidade** entre o sinal (ligante) e o receptor pode ser expressa na forma da constante de dissociação $K_d$, comumente $10^{-10}$M ou menos – ou seja, o receptor detecta concentrações picomolares da molécula sinalizadora. As interações receptor-ligante são quantificadas pela análise de

**(a) Especificidade**
A molécula sinalizadora se encaixa no sítio de ligação do receptor complementar; outros sinais não se encaixam.

**(b) Amplificação**
Quando enzimas ativam enzimas, o número de moléculas afetadas aumenta geometricamente na cascata enzimática.

**(c) Modularidade**
Proteínas com afinidades multivalentes formam diversos complexos de sinalização a partir de partes intercambiáveis.
A fosforilação fornece pontos de interação reversíveis.

**(d) Dessensibilização/Adaptação**
A ativação do receptor dispara um circuito de retroalimentação que desliga o receptor ou o remove da superfície celular.

**(e) Integração**
Quando dois sinais apresentam efeitos opostos sobre uma característica metabólica, como, por exemplo, a concentração de um segundo mensageiro X ou o potencial de membrana $V_m$, a regulação é consequência da ativação integrada dos dois [de ambos] receptores.

**FIGURA 12-1** **Cinco características dos sistemas de transdução de sinal.**

Scatchard, que fornece uma medida quantitativa da afinidade ($K_d$) e o número de sítios de interação com o ligante em uma amostra do receptor (Quadro 12-1).

A **cooperatividade** nas interações receptor-ligante causa grandes alterações na ativação do receptor em resposta a pequenas alterações na concentração do ligante (lembre-se do efeito da cooperatividade na ligação do oxigênio à hemoglobina; ver Figura 5-12). A **amplificação** ocorre quando uma enzima associada a um receptor de sinal é ativada e, por sua vez, catalisa a ativação de muitas moléculas de uma segunda enzima, ativando muitas moléculas de uma terceira enzima, e assim por diante, em uma **cascata enzimática** (Figura 12-1b). Essas cascatas podem produzir amplificações de várias ordens de magnitude em milissegundos. A resposta a um sinal também deve ser cessada, de modo que os efeitos a jusante sejam proporcionais à intensidade do estímulo original.

A **modularidade** das proteínas de sinalização permite que a célula misture e combine um conjunto de moléculas sinalizadoras para a criação de complexos com diferentes funções ou localizações celulares. Muitas proteínas sinalizadoras têm múltiplos domínios que reconhecem características específicas de outras proteínas, ou do citoesqueleto ou da membrana plasmática, e a multivalência resultante dos módulos individuais possibilita a montagem de uma ampla variedade de complexos multienzimáticos. Um tema comum em tais interações é a ligação de uma proteína de sinalização modular a resíduos fosforilados em outra proteína; a interação resultante pode ser regulada pela fosforilação ou desfosforilação da proteína parceira (Figura 12-1c). **Proteínas de ancoragem** sem atividade enzimática com afinidade por diversas enzimas que interagem em cascatas aproximam essas proteínas, garantindo sua interação em locais celulares e momentos específicos.

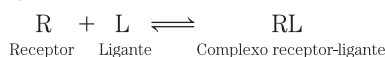
A sensibilidade dos sistemas receptores está sujeita a modificações. Quando um sinal está presente continuamente, ocorre a **dessensibilização** do sistema receptor (Figura 12-1d); quando o estímulo diminui, ficando abaixo de certo limite, o sistema torna-se novamente sensível. Pense no que acontece no seu sistema de transdução visual quando você passa de um lugar com muita luz solar para um quarto escuro ou da escuridão para a luz.

Uma última característica notável dos sistemas de transdução de sinal é a **integração** (Figura 12-1e), a capacidade de um sistema de receber múltiplos sinais e produzir uma resposta unificada apropriada às necessidades da célula ou do organismo. Diferentes rotas de sinalização se comunicam umas com as outras em diferentes níveis, gerando uma

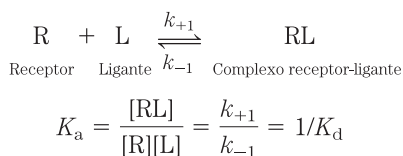
## QUADRO 12-1 MÉTODOS A análise de Scatchard quantifica a interação receptor-ligante

As ações celulares de um hormônio iniciam-se quando o hormônio (ligante, L) se liga específica e firmemente à sua proteína receptora (R) na célula-alvo. A ligação é mediada por interações não covalentes (ligações de hidrogênio, hidrofóbicas e eletrostáticas) entre as superfícies complementares do ligante e do receptor. A interação receptor-ligante causa uma alteração conformacional que altera a atividade biológica do receptor, que pode ser uma enzima, um regulador de enzima, um canal iônico ou um regulador de expressão gênica.

A interação receptor-ligante é descrita pela equação

$$\underset{\text{Receptor}}{R} + \underset{\text{Ligante}}{L} \rightleftharpoons \underset{\text{Complexo receptor-ligante}}{RL}$$

Esta ligação, como a de uma enzima ao seu substrato, depende das concentrações dos componentes interagentes e pode ser descrita por uma constante de equilíbrio:

$$\underset{\text{Receptor}}{R} + \underset{\text{Ligante}}{L} \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} \underset{\text{Complexo receptor-ligante}}{RL}$$

$$K_a = \frac{[RL]}{[R][L]} = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = 1/K_d$$

onde $K_a$ é a constante de associação e $K_d$ é a constante de dissociação.

Assim como a ligação enzima-substrato, a interação receptor-ligante é saturável. À medida que mais ligante é adicionado a uma quantidade fixa de receptor, uma fração cada vez maior de moléculas do receptor é ocupada pelo ligante (Figura Q-1a). Uma medida aproximada da afinidade é dada pela concentração do ligante necessária para proporcionar 50% de saturação do receptor. Ao usar a **análise de Scatchard** da interação receptor-ligante, é possível estimar a constante de dissociação $K_d$ e o número de sítios de ligação do receptor em uma dada preparação. Quando a ligação atinge o equilíbrio, o número total de sítios de ligação possíveis, $B_{máx}$, iguala-se ao número de sítios não ocupados, representado pela [R], mais o número de sítios ocupados pelo ligante, [RL]; isto é, $B_{máx} = [R] + [RL]$. O número de sítios não ligados pode ser expresso em termos de sítios totais menos os sítios ocupados: $[R] = B_{máx} - [RL]$. A expressão de equilíbrio pode ser descrita

$$K_a = \frac{[RL]}{[L](B_{máx} - [RL])}$$

Rearranjando para obter a razão ligante-receptor sobre ligante livre (não ligado), obtém-se

$$\frac{[\text{ligado}]}{[\text{livre}]} = \frac{[RL]}{[L]} = K_a(B_{máx} - [RL]) = \frac{1}{K_d}(B_{máx} - [RL])$$

Verifica-se que, de acordo com esta forma de inclinação-intercepção da equação, um gráfico de [ligante ligado]/[ligante livre] *versus* [ligante ligado] deve ser uma linha reta com uma inclinação de $-K_a$ $(-1/K_d)$ e uma intercepção na abcissa de $B_{máx}$, que é o número total de sítios de ligação (Figura Q-1b). As interações hormônio-ligante tipicamente têm valores de $K_d$ de $10^{-9}$ a $10^{-11}$M, o que corresponde a uma ligação muito firme.

A análise de Scatchard é confiável para os casos mais simples, mas, assim como nos gráficos de Lineweaver-Burk para enzimas, quando o receptor é uma proteína alostérica, as curvas desviam-se da linearidade.

**FIGURA Q-1** Análise de Scatchard para uma interação receptor-ligante. Um ligante radiomarcado (L) – um hormônio, por exemplo – é adicionado em várias concentrações a uma quantidade fixa de receptor (R), e a fração do hormônio ligado ao receptor é determinada pela separação do complexo receptor-hormônio (RL) do hormônio livre.

**(a)** A curva de [RL] *versus* [L] + [RL] (hormônio total adicionado) é hiperbólica, subindo para o máximo de [RL] à medida que os sítios do receptor tornam-se saturados. Para aferir os sítios de ligação não saturáveis, inespecíficos (p. ex., hormônios eicosanoides ligam-se inespecificamente à bicamada lipídica), uma série de outros experimentos de ligação é necessária. Um grande excesso de hormônio não marcado é adicionado juntamente com a solução diluída do hormônio marcado. As moléculas não marcadas competem com as moléculas marcadas pela ligação específica aos sítios saturáveis do receptor, mas não pela ligação inespecífica. O valor real da ligação específica é obtido ao se subtrair a ligação inespecífica da ligação total.

**(b)** Uma curva linear de [RL]/[L] *versus* [RL] fornece a $K_d$ e $B_{máx}$ do complexo receptor-hormônio. Compare essas curvas com aquelas da $V_o$ *versus* [S] e $1/V_o$ *versus* 1/[S] do complexo enzima-substrato (ver Figura 6-12, Quadro 6-1).

**TABELA 12-1 Alguns sinais aos quais as células respondem**

| | |
|---|---|
| Antígenos | Luz |
| Glicoproteínas/ oligossacarídeos da superfície celular | Toque mecânico |
| Sinais de desenvolvimento | Microrganismos, insetos, patógenos |
| Componentes da matriz extracelular | Neurotransmissores |
| Fatores de crescimento | Nutrientes |
| Hormônios | Odores |
| Hipóxia | Feromônios |
| | Sabores |

complexa "conversa cruzada" que mantém a homeostase da célula ou do organismo.

Uma das revelações da pesquisa sobre sinalização é o grau excepcional de conservação dos mecanismos de sinalização durante a evolução. Embora o número de sinais biológicos diferentes (Tabela 12-1) provavelmente seja da ordem de milhares, e os tipos de respostas provocadas por esses sinais também sejam numerosos, a maquinaria de transdução de todos esses sinais tem como base cerca de 10 tipos básicos de componentes proteicos.

Este capítulo mostra alguns exemplos das principais classes de mecanismos de sinalização, examinando como eles são integrados em funções biológicas específicas, como a transmissão de sinais nervosos; respostas a hormônios e fatores de crescimento; os sentidos da visão, do olfato e do paladar; e o controle do ciclo celular. Frequentemente, o resultado final de uma rota de sinalização é a fosforilação de algumas proteínas específicas na célula-alvo, que têm suas atividades alteradas e, assim, alteram as atividades da célula. Ao longo desta discussão, será dada ênfase à conservação dos mecanismos fundamentais da transdução de sinais biológicos e à adaptação desses mecanismos básicos a uma ampla gama de rotas de sinalização.

Serão abordados detalhes moleculares de vários sistemas representativos de transdução de sinal, classificados de acordo com o tipo de receptor. O gatilho de cada sistema é diferente, mas as características gerais da transdução de sinal são comuns a todos: um sinal interage com o receptor; o receptor ativado interage com a maquinaria celular, produzindo um segundo sinal ou uma alteração na atividade de uma proteína celular; a atividade metabólica da célula-alvo sofre uma modificação; e, finalmente, o evento de transdução termina. Para ilustrar essas características gerais dos sistemas sinalizadores, serão examinados exemplos de seis tipos básicos de receptores (**Figura 12-2**).

1. *Receptores associados a proteínas G* que ativam *indiretamente* (por meio de proteínas de ligação ao GTP, ou proteínas G) enzimas que geram segundos mensageiros intracelulares. Esse tipo de receptor é ilustrado pelo sistema receptor β-adrenérgico, que detecta adrenalina (Seção 12.2).

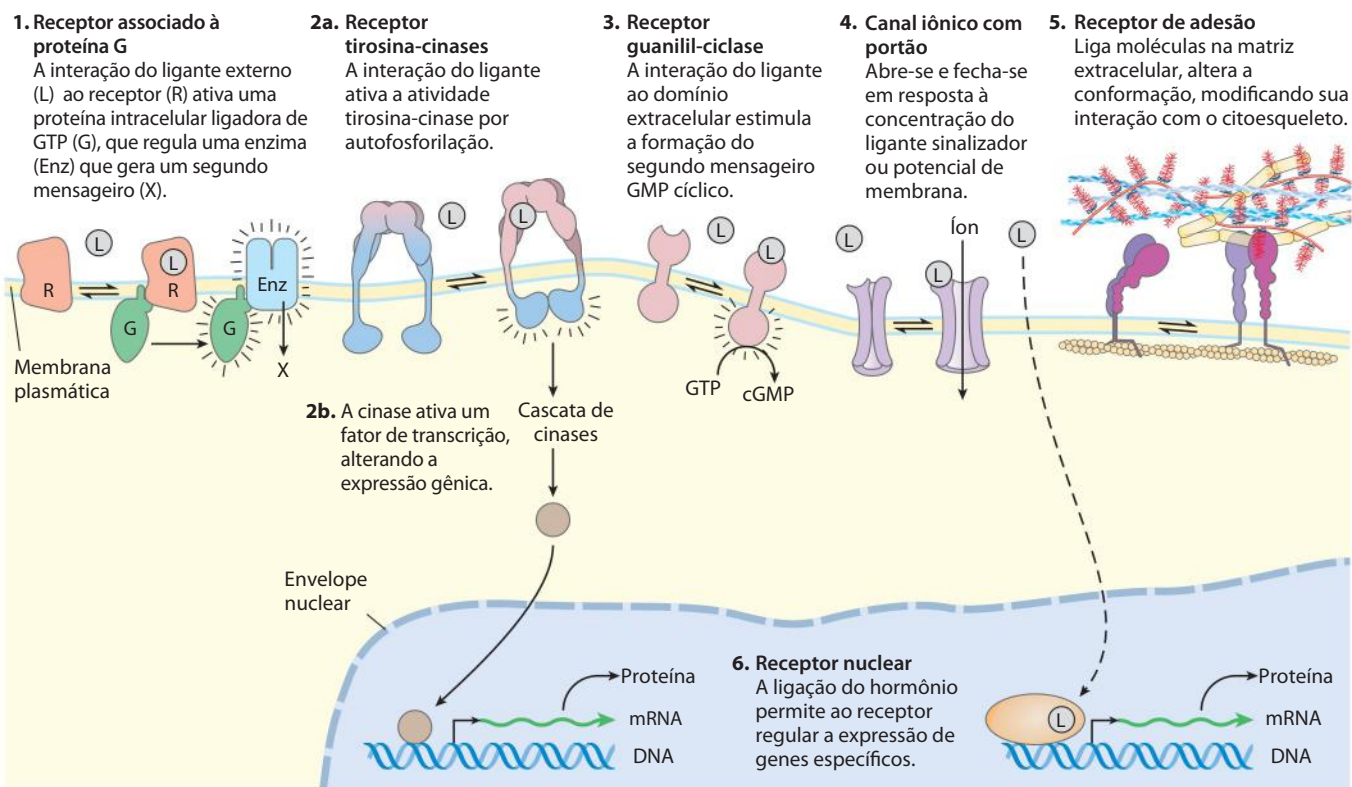



**FIGURA 12-2 Os seis tipos gerais de transdutores de sinal.**

2. *Receptores tirosinas-cinases*, receptores da membrana plasmática que também são enzimas. Quando um desses receptores é ativado pelo seu ligante extracelular, ele catalisa a fosforilação de diversas proteínas citosólicas ou da membrana plasmática. O receptor de insulina é um exemplo (Seção 12.3); o receptor do fator de crescimento da epiderme (EGFR, de *epidermal growth factor receptor*) é outro.
3. *Receptores guanilil-ciclases*, que também são receptores da membrana plasmática com um domínio enzimático citoplasmático. O segundo mensageiro intracelular para esses receptores, o monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), ativa uma proteína-cinase citosólica que fosforila proteínas celulares, alterando suas atividades (Seção 12.4).
4. *Canais iônicos com portões* na membrana plasmática, que abrem e fecham (por isso o termo "portões") em resposta à interação de ligantes químicos ou alterações no potencial transmembrana. Esses são os transdutores de sinal mais simples. O canal iônico do receptor de acetilcolina é um exemplo desse mecanismo (Seção 12-6).
5. *Receptores de adesão*, que interagem com componentes macromoleculares da matriz extracelular (como o colágeno) e transmitem instruções para o sistema do citoesqueleto sobre migração ou adesão à matriz. As integrinas ilustram esse tipo de mecanismo de transdução (Seção 12-7).
6. *Receptores nucleares*, que interagem com ligantes específicos (como o hormônio estrogênio) e alteram a taxa em que genes específicos são transcritos e traduzidos em proteínas celulares. Funcionando por mecanismos intimamente relacionados à regulação da expressão gênica, os hormônios esteroides serão considerados aqui apenas sucintamente (Seção 12-8), com uma discussão detalhada de suas ações no Capítulo 28.

Ao começar esta discussão sobre sinalização biológica, tornam-se necessárias algumas observações sobre a nomenclatura de proteínas sinalizadoras. Em geral, essas proteínas são descobertas em determinado contexto e chamadas de acordo com esse contexto, sendo então implicadas em uma gama mais ampla de funções biológicas para as quais seu nome original não auxilia mais. Por exemplo, a proteína retinoblastoma, pRb, foi identificada inicialmente como local de uma mutação que contribui para o câncer de retina (retinoblastoma), mas agora se sabe que atua em muitas rotas essenciais para a divisão celular em todas as células, não somente nas da retina. A alguns genes e proteínas são dados nomes não comprometedores: a proteína supressora tumoral p53, por exemplo, é uma *p*roteína de *53* kDa, mas esse nome não fornece indícios da sua grande importância na regulação da divisão celular e no desenvolvimento do câncer. Este capítulo define em linhas gerais os nomes dessas proteínas à medida que elas aparecem, apresentando os nomes comumente usados pelos pesquisadores da área. Não desanime se não conseguir gravá-los de primeira!

**RESUMO 12.1 Características gerais da transdução de sinal**

- Todas as células têm mecanismos de transdução de sinal específicos e altamente sensíveis, que foram conservados durante a evolução.
- Vários estímulos atuam por meio de receptores proteicos específicos.
- Os receptores ligam a molécula sinalizadora, e iniciam um processo que amplifica o sinal, integra-o com o sinal de outros receptores e transmite a informação pela célula. Se o sinal persiste, a dessensibilização do receptor reduz ou cessa a resposta.
- Os organismos multicelulares têm seis tipos básicos de mecanismos sinalizadores: proteínas da membrana plasmática que atuam por meio de proteínas G, receptores tirosina-cinases, receptores guanilil-ciclases, que atuam por meio de proteínas-cinases, canais iônicos com portões, receptores de adesão, que transmitem informação entre a matriz extracelular e o citoesqueleto, e receptores nucleares que ligam esteroides e alteram a expressão gênica.

## 12.2 Receptores associados a proteínas G e segundos mensageiros

Os **receptores associados a proteínas G** (**GPCR**, de *G protein-coupled receptors*), como o nome implica, são receptores associados a um membro da família de **proteínas de ligação a nucleotídeos de guanosina** (**proteínas G**). Três componentes essenciais definem a transdução de sinalização via GPCR: um receptor na membrana plasmática com sete segmentos helicoidais transmembrana, uma proteína G que alterna entre as formas ativa (ligada a GTP) e inativa (ligada a GDP), e uma enzima efetora (ou canal iônico) na membrana plasmática que é regulada pela proteína G ativada. A proteína G, estimulada pelo receptor ativado, troca o GDP ligado a ela por GTP, e, então, dissocia-se do receptor ocupado e liga-se à enzima efetora vizinha, alterando sua atividade. A enzima ativada, então, gera um **segundo mensageiro** que afeta alvos a jusante. O genoma humano codifica cerca de 350 GPCR que detectam hormônios, fatores de crescimento e outros ligantes endógenos, e talvez 500 que atuam como receptores olfativos e gustativos.

Os GPCR têm sido implicados em muitas doenças humanas comuns, incluindo alergias, depressão, cegueira, diabetes e várias deficiências cardiovasculares, com sérias consequências para a saúde. Quase metade de *todos* os fármacos no mercado tem como alvo algum GPCR. Por exemplo, o receptor $\beta$-adrenérgico, que controla os efeitos da adrenalina, é o alvo dos "bloqueadores beta", prescritos para condições tão diversas como hipertensão, arritmia cardíaca, glaucoma, ansiedade e enxaqueca. Pelo menos 150 dos GPCR encontrados no genoma humano ainda são "receptores órfãos": seus ligantes naturais ainda não foram identificados e nada se sabe sobre sua biologia. O receptor $\beta$-adrenérgico, cuja biologia e farma-

cologia são bem-compreendidas, é o protótipo de todos os GPCR, e nossa discussão sobre os sistemas transdutores de sinal inicia-se com ele. ■

## O sistema receptor $\beta$-adrenérgico atua por meio do segundo mensageiro cAMP

A adrenalina dispara o alarme quando alguma ameaça exige que o organismo mobilize sua maquinaria de geração de energia; ela sinaliza a necessidade de "lutar ou fugir". A ação da adrenalina é iniciada quando o hormônio liga-se ao seu receptor proteico na membrana plasmática de uma célula sensível à adrenalina. Os **receptores adrenérgicos** são de quatro tipos básicos, $\alpha_1$, $\alpha_2$, $\beta_1$ e $\beta_2$, definidos pelas diferenças nas afinidades e respostas a um grupo de agonistas e antagonistas. Os **agonistas** são análogos estruturais que se ligam a um receptor e mimetizam o efeito normal do ligante natural; os **antagonistas** são análogos que se ligam ao receptor sem disparar o efeito normal e, desta forma, bloqueiam os efeitos dos agonistas, incluindo o ligante biológico. Em alguns casos, a afinidade do receptor por agonistas ou antagonistas sintéticos é maior do que pelo agonista natural (**Figura 12-3**). Os quatro tipos de receptores adrenérgicos são encontrados em tecidos-alvo diferentes e controlam respostas diferentes à adrenalina. Aqui, serão apresentados os **receptores $\beta$-adrenérgicos** do músculo, do fígado e do tecido adiposo. Esses receptores controlam alterações no metabolismo energético, conforme descrito no Capítulo 23, incluindo o aumento na degradação de glicogênio e gordura. Os receptores adrenérgicos dos subtipos $\beta_1$ e $\beta_2$ atuam por meio do mesmo

Adrenalina — $K_d$ (μM): 5
Isoproterenol (agonista) — 0,4
Propanolol (antagonista) — 0,0046

**FIGURA 12-3 Adrenalina e seus análogos sintéticos.** A adrenalina, é liberada da glândula suprarrenal e regula o metabolismo energético no músculo, no fígado e no tecido adiposo. Também atua como neurotransmissor nos neurônios adrenérgicos, e sua afinidade pelo receptor se expressa sob a forma de uma constante de dissociação para o complexo receptor-ligante. O isoproterenol e propanolol são análogos sintéticos, o primeiro um agonista com afinidade pelo receptor maior do que a da adrenalina, e o segundo um antagonista com afinidade extremamente alta.

mecanismo; assim, neste texto, "$\beta$-adrenérgico" aplica-se a ambos os tipos.

Como todos os GPCR, o receptor $\beta$-adrenérgico é uma proteína integral com sete regiões hidrofóbicas helicoidais com 20 a 28 resíduos de aminoácidos, que atravessam a membrana plasmática sete vezes, assim originando o nome alternativo **receptores hepta-helicoidais** para os GPCR. A ligação da adrenalina ao sítio no receptor mergulhado na membrana plasmática (**Figura 12-4a**, etapa ❶) promove uma alteração conformacional no domínio intracelular do receptor que afeta sua interação com uma proteína G associada, promovendo a dissociação do GDP e a ligação do GTP (etapa ❷). Em todos os GPCR, a proteína G é heterotrimérica, composta por três subunidades diferentes: $\alpha$, $\beta$ e $\gamma$. Tais proteínas G são, portanto, conhecidas como **proteínas G triméricas**. Neste caso, é a subunidade $\alpha$ que se liga ao GDP ou GTP e transmite o sinal do receptor ativado para a proteína efetora. Como esta proteína G ativa o seu efetor, ela é chamada de **proteína G estimulatória**, ou **$G_s$**. Assim como outras proteínas G (Quadro 12-2), a $G_s$ funciona como um "comutador" biológico: quando o sítio de ligação a nucleotídeos na $G_s$ (na subunidade $\alpha$) é ocupado por GTP, a $G_s$ é ativada e pode ativar sua proteína efetora (neste caso, a adenilil-ciclase); com GDP ligado ao sítio, a $G_s$ é inativada. Na forma ativa, as subunidades $\beta$ e $\gamma$ da $G_s$ dissociam-se, sob a forma de um dímero $\beta\gamma$, da subunidade $\alpha$, e a $G_{s\alpha}$, com o GTP ligado, move-se, no plano da membrana, do receptor a uma molécula de adenilil-ciclase próxima (etapa ❸). A $G_{s\alpha}$ é mantida na membrana pela ligação covalente a um grupo palmitoil (ver Figura 11-15).

A **adenilil-ciclase** é uma proteína integral da membrana plasmática, com o sítio ativo na face citoplasmática. A associação de $G_{s\alpha}$ ativa com a adenilil-ciclase estimula a ciclase a catalisar a síntese de cAMP a partir de ATP (Figura 12-4a, etapa ❹, e Figura 12-4b), elevando a [cAMP] citosólica. A interação entre $G_{s\alpha}$ e adenilil-ciclase é possível apenas quando $G_{s\alpha}$está ligada a GTP.

O estímulo por $G_{s\alpha}$ é autolimitante; *$G_{s\alpha}$ tem uma atividade GTPásica intrínseca que inativa a si mesma* por meio da conversão a GDP do GTP ligado (**Figura 12-5**). A $G_{s\alpha}$, agora inativa, dissocia-se da adenilil-ciclase, causando a inativação da ciclase. A $G_{s\alpha}$ reassocia-se com o dímero $\beta\gamma$ ($G_{s\beta\gamma}$), e a $G_s$ inativa está novamente disponível para interagir com um receptor ligado ao hormônio.

O papel de $G_{s\alpha}$ como um "comutador" proteico biológico não é exclusivo. Diversas proteínas G agem como comutadores binários em sistemas de sinalização com GPCR e em muitos processos que envolvem fusão ou fissão de membranas (Quadro 12-2). **Proteínas G triméricas: comutadores liga/desliga moleculares**

A adrenalina exerce seus efeitos a jusante pelo aumento na [cAMP] que resulta da ativação da adenilil-ciclase. O AMP cíclico, por sua vez, ativa alostericamente a **proteína-cinase dependente de cAMP**, também chamada de **proteína-cinase A** ou **PKA** (Figura 12-4a, etapa ❺), a qual catalisa a fosforilação de resíduos de Ser ou Thr em proteínas-alvo, incluindo a cinase da glicogênio-fosforilase *b*. Essa enzima está ativa quando fosforilada

**FIGURA 12-4 A transdução do sinal da adrenalina: a rota β-adrenérgica.** **(a)** O mecanismo que acopla a ligação da adrenalina ao seu receptor com a ativação da adenilil-ciclase (AC); as sete etapas são discutidas em maior detalhe no texto. A mesma molécula de adenilil-ciclase na membrana plasmática pode ser regulada por uma proteína G estimulatória ($G_s$), conforme mostrado, ou uma proteína G inibitória ($G_i$, não mostrado). A $G_s$ e a $G_i$ estão sob a influência de hormônios diferentes. Os hormônios que induzem a ligação do GTP à $G_i$ causam inibição da adenilil-ciclase, resultando em uma diminuição da [cAMP] celular. **(b)** A ação combinada das enzimas que catalisam as etapas 4 e 7, a síntese e a hidrólise do cAMP pela adenilil-ciclase e pela fosfodiesterase do cAMP, respectivamente.

e pode iniciar o processo de mobilização do glicogênio a partir dos seus estoques no músculo e no fígado, na expectativa da necessidade de energia, como é sinalizado pela adrenalina.

A forma inativa da PKA contém duas subunidades catalíticas idênticas (C) e duas subunidades de regulação (R) (**Figura 12-6a**). O complexo tetramérico $R_2C_2$ é cataliticamente inativo, pois um domínio autoinibitório em cada

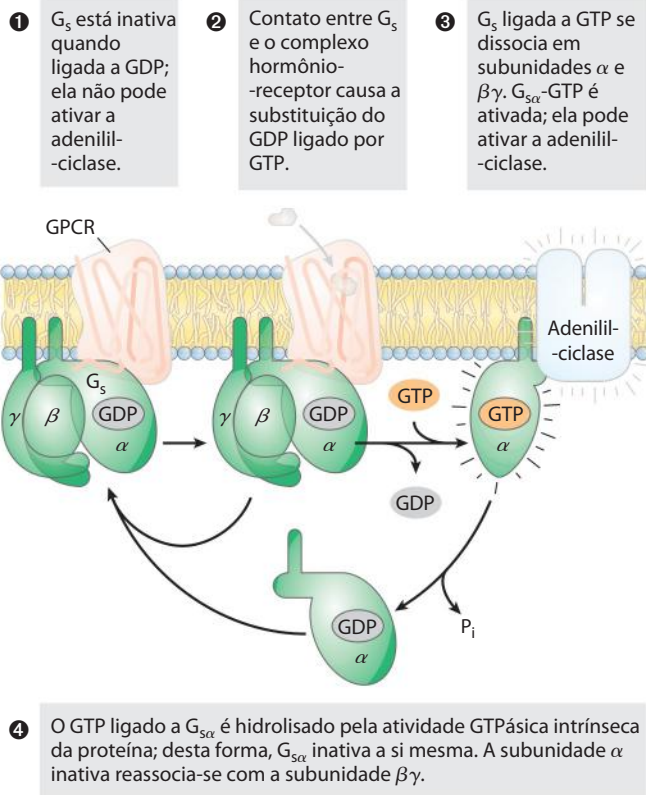



**FIGURA 12-5 O comutador GTPase.** As proteínas G alternam entre a ligação a GDP (desligada) e GTP (ligada). A atividade GTPásica intrínseca da proteína, em muitos casos estimulada pelas proteínas RGS (reguladores da sinalização por proteínas G; ver Quadro 12-2), determina quão rapidamente o GTP ligado é hidrolisado a GDP e, assim, por quanto tempo a proteína G permanece ativa.

subunidade R ocupa a fenda de ligação ao substrato de cada subunidade C. Quando as subunidades R estão ligadas a cAMP, elas passam por uma alteração na conformação, que afasta o domínio autoinibitório de R do domínio catalítico de C, e o complexo $R_2C_2$ se dissocia, originando duas subunidades C livres e cataliticamente ativas. Esse mesmo mecanismo básico – o deslocamento de um domínio inibitório – controla a ativação alostérica pelos segundos mensageiros de muitos tipos de proteínas-cinases (como nas Figuras 12-14 e 12-22, por exemplo). A estrutura da fenda de ligação ao substrato na PKA é o protótipo para todas as proteínas--cinases conhecidas (Figura 12-6b); certos resíduos nessa fenda são idênticos em todas as mais de 1.000 proteínas--cinases conhecidas. O sítio de ligação do ATP de cada subunidade catalítica posiciona perfeitamente o ATP para a transferência de seu grupo fosfato terminal ($\gamma$) para o –OH da cadeia lateral de um resíduo de Ser ou Thr.

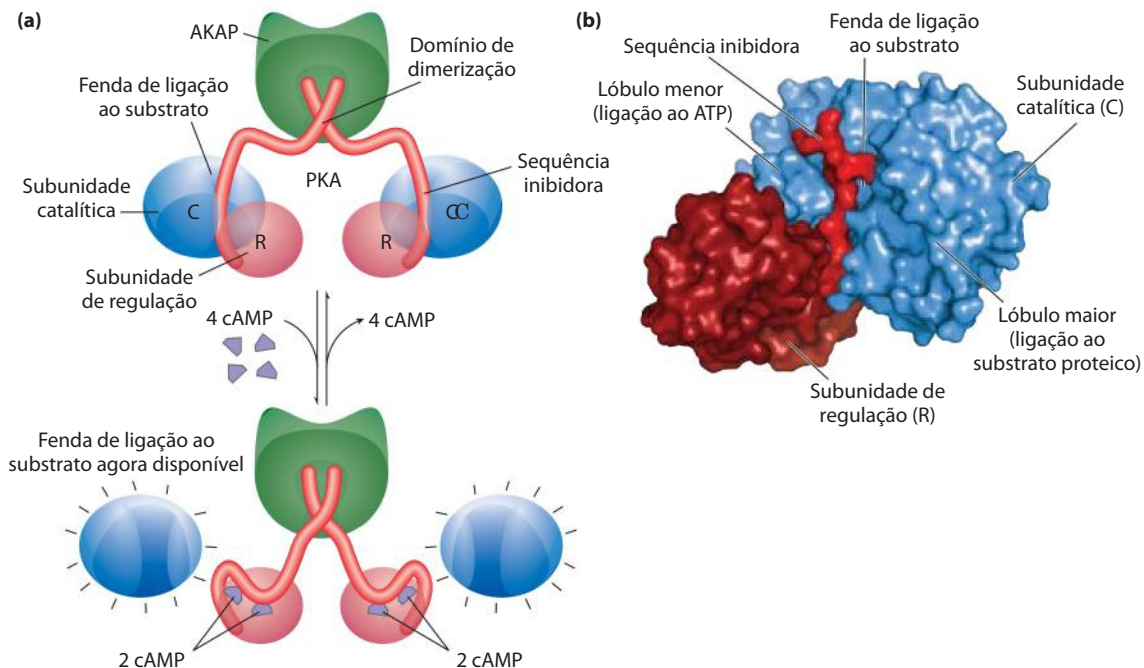



**FIGURA 12-6 Ativação da proteína-cinase dependente de cAMP (PKA). (a)** Quando a [cAMP] está baixa, as duas subunidades de regulação idênticas (R; em vermelho) se associam com as duas subunidades catalíticas idênticas (C). Neste complexo $R_2C_2$, as sequências inibidoras das subunidades R se inserem na fenda de ligação ao substrato das subunidades C e impedem a ligação dos substratos; o complexo está, portanto, cataliticamente inativo. As sequências aminoterminais das subunidades R interagem para a formação de um dímero $R_2$, o sítio de ligação para uma proteína de ancoragem para a cinase A (AKAP), descrita posteriormente no texto. Quando a [cAMP] aumenta em resposta a um sinal hormonal, cada subunidade R se liga a duas moléculas de cAMP e sofre uma drástica reorganização que afasta a sequência inibidora da subunidade C, abrindo a fenda de ligação ao substrato e liberando cada subunidade C na forma cataliticamente ativa. **(b)** Estrutura cristalográfica mostrando parte do complexo $R_2C_2$ (identidade no PDB 1U7E) – uma subunidade C e parte da subunidade R. A região aminoterminal de dimerização da subunidade R foi omitida para simplicidade. O lóbulo menor de C contém o sítio de ligação a ATP, e o lóbulo maior circunda e define a fenda na qual o substrato proteico se liga e é fosforilado em um resíduo de Ser ou Thr, sendo o grupo fosfato transferido a partir do ATP. Nesta forma inativa, a sequência inibidora de R bloqueia a fenda de ligação ao substrato de C, inativando-a.

## QUADRO 12-2  MEDICINA Proteínas G: comutadores binários na saúde e na doença

Alfred G. Gilman e Martin Rodbell (Figura Q-1) descobriram as funções cruciais das proteínas de ligação a nucleotídeos de guanosina (proteínas G) em vários processos celulares, incluindo percepção sensorial, sinalização na divisão celular, crescimento e diferenciação, movimentos intracelulares de proteínas e vesículas membranosas e síntese proteica. O genoma humano codifica aproximadamente 200 dessas proteínas, que diferem em tamanho e estrutura de subunidades, localização intracelular e função. Porém, todas as proteínas G compartilham uma característica comum: elas podem ser ativadas e, após um breve período, autoinativar-se, atuando como comutadores moleculares binários com temporizador integrado. Essa superfamília de proteínas inclui as proteínas G heterotriméricas, envolvidas na sinalização adrenérgica ($G_s$ e $G_i$) e da visão (transducina); proteínas G pequenas, como as envolvidas na sinalização da insulina (Ras) e outras que atuam no tráfego de vesículas (ARF e Rab), no transporte para dentro e fora do núcleo (Ran; ver Figura 27-42) e na sincronia do ciclo celular (Rho); e muitas proteínas envolvidas na síntese proteica (fator de iniciação IF2 e fatores de alongamento EF-Tu e EF-G; ver Capítulo 26). Muitas proteínas G têm lipídeos ligados covalentemente, que lhes conferem afinidade pelas membranas e determinam suas localizações na célula.

Todas as proteínas G têm a mesma estrutura central e usam o mesmo mecanismo que as faz ciclar entre uma conformação inativa, favorecida quando há GDP ligado, e uma conformação ativa, favorecida quando há GTP ligado. Utiliza-se a proteína Ras (~20 kDa), unidade sinalizadora mínima, como protótipo para todos os membros dessa superfamília (Figura Q-2).

Na conformação ligada a GTP, a proteína G expõe regiões previamente escondidas (chamadas de **comutador I** e **comutador II**), que interagem com proteínas a jusante na rota sinalizadora, até que a proteína G se autoinative ao hidrolisar seu GTP a GDP. Um ponto determinante na conformação da proteína G é o fosfato γ do GTP, que interage com a região chamada de **alça P** (de ligação a fosfato, *phosphate-binding*; Figura Q-3). Na Ras, o

**FIGURA Q-1** Alfred G. Gilman (esquerda) e Martin Rodbell (1925-1998). Suas conferências do Prêmio Nobel sobre a descoberta e exploração das proteínas G estão disponíveis em www.nobelprize.org.

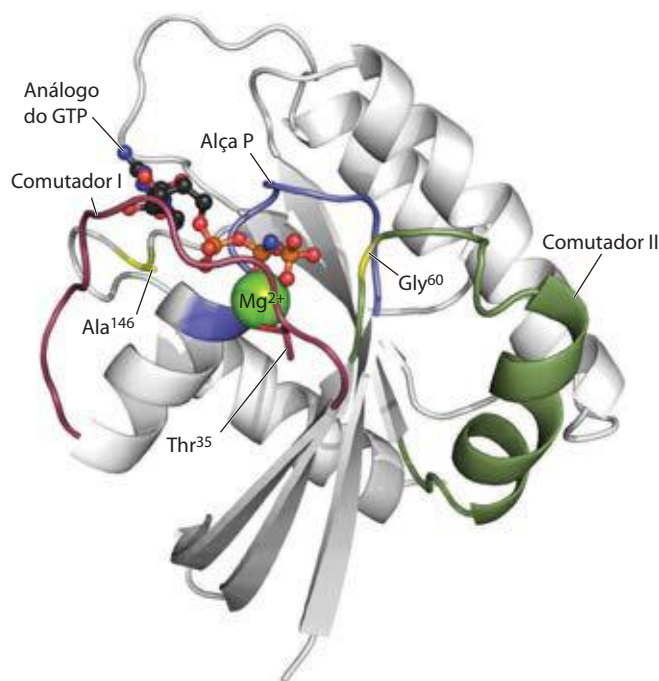



**FIGURA Q-2** A proteína Ras, o protótipo para todas as proteínas G (PDB ID 5P21). O $Mg^{2+}$-GTP é mantido por resíduos críticos na alça P de ligação ao fosfato (em azul) e pela $Thr^{35}$ na região comutadora I (em vermelho) e $Gly^{60}$ na região comutadora II (em verde). A $Ala^{146}$ é responsável pela especificidade de GTP no lugar de ATP. Nesta estrutura, o análogo não hidrolisável do GTP Gpp(NH)P está presente no sítio de ligação do GTP.

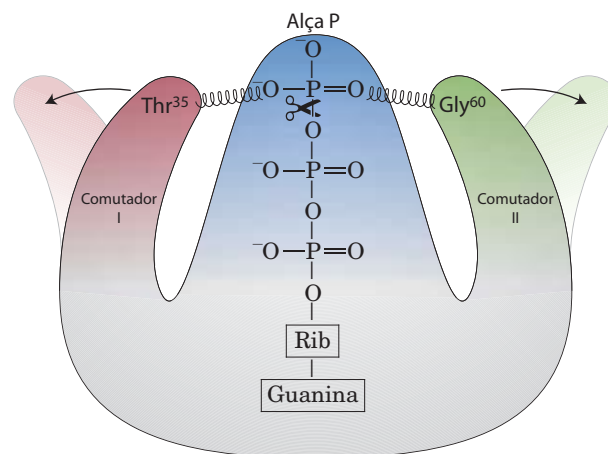



**FIGURA Q-3** Quando o GTP ligado é hidrolisado pelas atividades GTPásicas da Ras e sua GAP, a perda das ligações de hidrogênio com $Thr^{35}$ e $Gly^{60}$ permite que as regiões comutadoras I e II relaxem a uma conformação na qual elas não mais estão disponíveis para interagirem com alvos a jusante, como Raf.

*(Continua na próxima página)*

QUADRO 12-2  MEDICINA **Proteínas G: comutadores binários na saúde e na doença (*Continuação*)**

fosfato γ do GTP liga-se a um resíduo de Lys na alça P e a dois resíduos críticos, $Thr^{35}$ no comutador I e $Gly^{60}$ no comutador II, que formam ligações de hidrogênio com os oxigênios do fosfato γ do GTP. Essas ligações de hidrogênio funcionam como um par de molas que seguram a proteína na sua conformação ativa. Quando o GTP é hidrolisado a GDP e o $P_i$ é liberado, essas ligações de hidrogênio são perdidas; a proteína relaxa para a sua conformação inativa, escondendo os sítios que interagem com outros parceiros quando no estado ativo. A $Ala^{146}$ forma ligações de hidrogênio com o oxigênio da guanosina, permitindo a ligação de GTP, mas não de ATP.

A atividade GTPásica intrínseca das proteínas G é aumentada em até $10^5$ vezes pelas **proteínas ativadoras de GTPases** (**GAP**, de *GTPase activator proteins*), também chamadas, no caso das proteínas G heterotriméricas, **reguladores da sinalização por proteínas G** (**RGS**, de *regulators of G protein signaling*; Figura 4). Assim, GAP e RGS determinam por quanto tempo o comutador permanece "ligado". Elas contribuem com um resíduo de Arg essencial, que penetra no sítio ativo GTPásico da proteína G e auxilia na catálise. O processo intrinsecamente lento de substituição do GDP ligado por GTP, ativando a proteína, é catalisado pelos **fatores de troca de nucleotídeos de guanosina** (**GEF**, de *guanosine nucleotide-exchange factors*) associados às proteínas G (Figura Q-4).

**FIGURA Q-4** Os fatores que regulam a atividade das proteínas G (em verde). As proteínas G inativas (tanto as proteínas G pequenas, como a Ras, quanto as proteínas G heterotriméricas, como a $G_s$) interagem com fatores de troca GTP-GDP, GEF (em vermelho; frequentemente são receptores ativados[*], como rodopsina, receptores β-adrenérgicos e Sos) a montante, sendo ativadas pela ligação de GTP. Nesta forma, as proteínas G ativam enzimas efetoras a jusante (em azul; enzimas como a cGMP-fosfodiesterase, adenilil-ciclase e Raf). As proteínas ativadoras de GTPase (GAP, no caso das proteínas G pequenas) e os reguladores da sinalização por proteínas G (RGS) (em amarelo), ao modularem a atividade GTPásica das proteínas G, determinam quanto tempo elas permanecem ativas.

Como as proteínas G desempenham funções cruciais em muitos processos de sinalização, não é surpreendente que defeitos nessas proteínas levem a diversas doenças. Em cerca de 25% de todos os cânceres humanos (proporção muito maior em certos tipos de câncer), há uma mutação na proteína Ras – tipicamente em um dos resíduos críticos próximos ao sítio de ligação a GTP ou na alça P – que praticamente anula a atividade GTPásica. Uma vez ativadas pela ligação de GTP, essas proteínas Ras permanecem constitutivamente ativas, promovendo a divisão celular em células que não deveriam estar se dividindo. O gene supressor tumoral *NF1* codifica para uma GAP que intensifica a atividade GTPásica da Ras normal. As mutações em *NF1* que resultam em uma GAP não funcional deixam Ras apenas com sua atividade GTPásica intrínseca; uma vez ativada pela ligação de GTP, a Ras permanece ativa, continuando a enviar o sinal: dividam-se.

Proteínas G heterotriméricas defeituosas também podem levar a doenças. Mutações no gene que codifica a subunidade α de $G_s$ (a qual controla alterações na [cAMP] em resposta a estímulos hormonais) pode resultar em uma proteína $G_s$ que está permanentemente ativa ou permanentemente inativa. As mutações "ativadoras" em geral ocorrem nos resíduos cruciais para a atividade GTPásica; elas levam a uma [cAMP] continuamente elevada, com consequências a jusante, incluindo a proliferação celular indesejada. Por exemplo, tais mutações são encontradas em cerca de 40% dos tumores da hipófise (adenomas). Os indivíduos com mutações "inativadoras" em $G_\alpha$ não respondem aos hormônios que atuam via cAMP (como o hormônio da tireoide). As mutações no gene para a subunidade α da transducina ($T_\alpha$), que está envolvida na sinalização da visão, causam um tipo de cegueira noturna, aparentemente devido à interação defeituosa entre a subunidade $T_\alpha$ e a fosfodiesterase do segmento externo dos bastonetes (ver Figura 12-39). Uma variação na sequência do gene que codifica para a subunidade β de uma proteína G heterotrimérica é comumente encontrada em indivíduos com hipertensão (pressão sanguínea elevada), e suspeita-se que essa variante gênica esteja envolvida em obesidade e aterosclerose.

As bactérias patogênicas que causam cólera e coqueluche produzem toxinas que atacam proteínas G, interferindo com a sinalização normal das células hospedeiras. A **toxina do cólera**, secretada pelo *Vibrio cholerae* no intestino da pessoa infectada, é uma proteína heterodimé-

Como indicado na Figura 12-4a (etapa ❻), a PKA regula algumas enzimas a jusante na rota de sinalização (Tabela 12-2). Embora esses alvos a jusante tenham diferentes funções, eles compartilham uma região de similaridade de sequência próxima ao resíduo de Ser ou Thr que é fosforilado, sequência que os marca para a regulação por PKA. A fenda de ligação ao substrato da PKA reconhece essas sequências, e a enzima fosforila o resíduo de Ser ou Thr.

$G_s$ normal: A atividade GTPásica finaliza a sinalização do receptor para a adenilil-ciclase.

$G_s$ ADP-ribosilada: A atividade GTPásica está inativada; $G_s$ ativa constantemente a adenilil-ciclase.

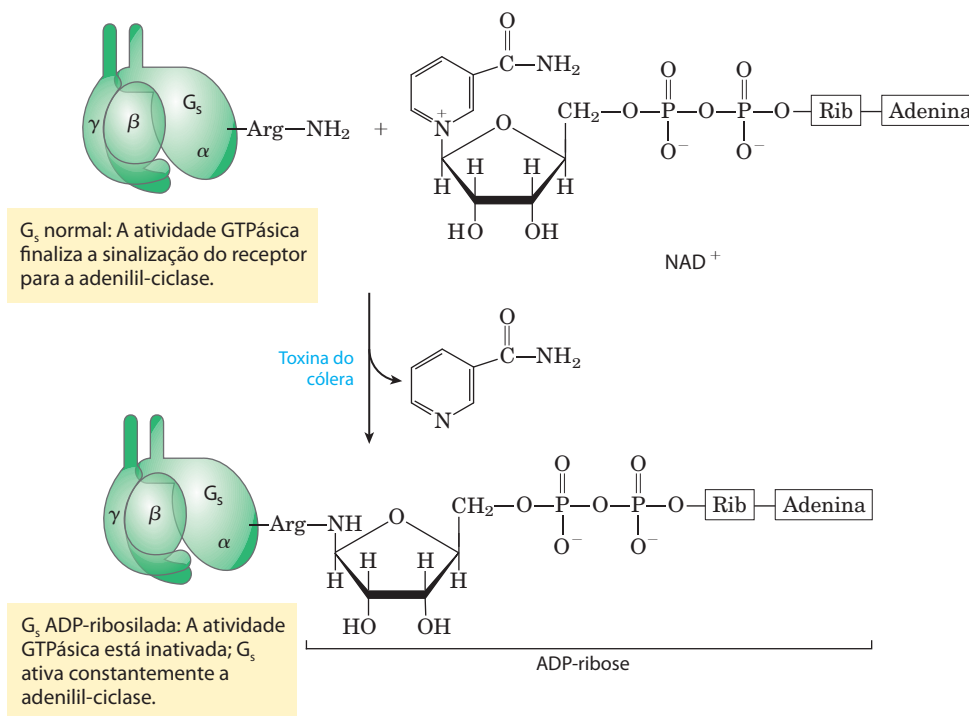



**FIGURA Q-5** As toxinas bacterianas que causam cólera e coqueluche (toxina pertussis) são enzimas que catalisam a transferência da porção ADP-ribose do $NAD^+$ a um resíduo de Arg de $G_s$ (no caso da toxina do cólera, como mostrado aqui) ou a um resíduo de Cys de $G_i$ (toxina pertussis). As proteínas G assim modificadas não respondem aos estímulos hormonais normais. A patologia de ambas as doenças é causada pela regulação alterada da adenilil-ciclase e superprodução de cAMP.

rica. A subunidade B reconhece e liga-se a gangliosídeos específicos na superfície das células do epitélio intestinal, fornecendo uma via para a entrada da subunidade A nessas células. Após a entrada, a subunidade A é quebrada em dois fragmentos: o fragmento A1 e o fragmento A2. A1, então, associa-se com o fator de ribosilação de ADP, ARF6, pequena proteína G das células hospedeiras, por meio de resíduos nas regiões comutadoras I e II – as quais estão acessíveis apenas quando ARF6 está em sua forma ativa (ligada a GTP). Essa associação com ARF6 ativa A1, que catalisa a transferência de ADP-ribose do $NAD^+$ ao resíduo de Arg crítico da alça P da subunidade $\alpha$ de $G_s$ (Figura 5). A ADP-ribosilação bloqueia a atividade GTPásica de $G_s$ e assim torna $G_s$ permanentemente ativa. Isso resulta na contínua ativação da adenilil-ciclase das células do epitélio intestinal, [cAMP] cronicamente elevada e PKA cronicamente ativa. A PKA fosforila o canal de $Cl^-$ CFTR (ver Quadro 11-2) e um trocador de $Na^+$-$H^+$ das células do epitélio intestinal. O resultante efluxo de NaCl provoca uma perda massiva de água pelo intestino, à medida que as células respondem ao desequilíbrio osmótico que se estabelece. A severa desidratação e a perda de eletrólitos são as principais patologias do cólera. Elas podem ser fatais na ausência de uma rápida terapia de reidratação.

A **toxina pertussis**, produzida por *Bordetella pertussis*, catalisa a ADP-ribosilação da subunidade $\alpha$ de $G_i$, impedindo a troca GDP-GTP e bloqueando a inibição da adenilil-ciclase por $G_i$. A bactéria infecta o trato respiratório, onde destrói as células do epitélio ciliar que normalmente removem o muco. Sem a ação ciliar, uma tosse forte é necessária para a limpeza do trato respiratório; isso origina os nomes tosse comprida ou tosse espasmódica (que disseminam a bactéria para outras pessoas) dessa doença. Ainda não está claro como o defeito na sinalização por proteína G causa a morte das células do epitélio ciliar.

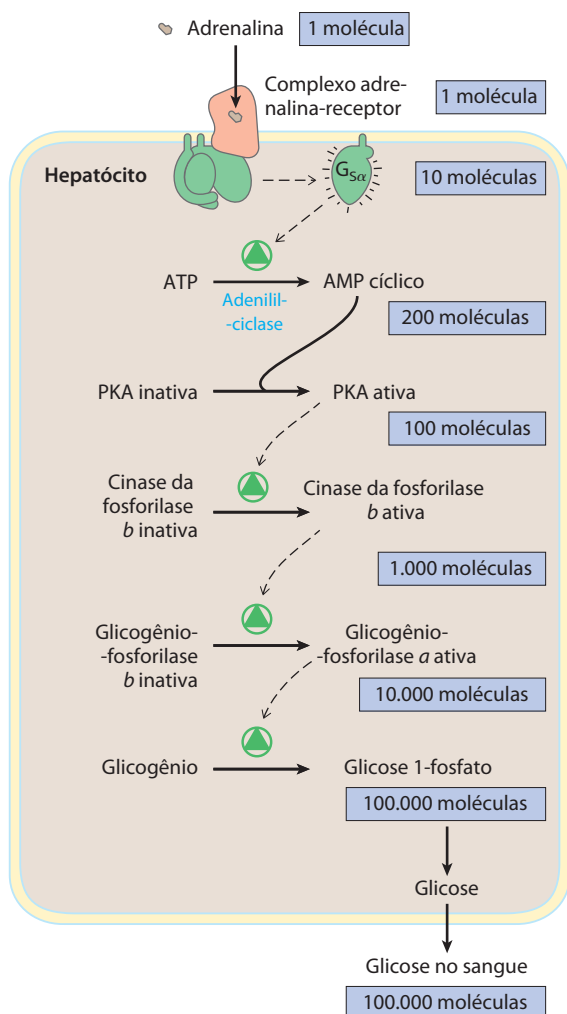
Dado o grande número de receptores associados a proteínas G no genoma humano, é provável que estudos futuros revelem muito mais exemplos de como os defeitos na sinalização por proteínas G afetam a saúde humana.

A comparação das sequências de várias proteínas que são substratos para a PKA gerou a **sequência consenso** – os resíduos vizinhos necessários para marcar um resíduo de Ser ou Thr para fosforilação (ver Tabela 12-2).

Como em muitas rotas de sinalização, a transdução de sinal pela adenilil-ciclase envolve várias etapas que *amplificam* o sinal hormonal original (**Figura 12-7**). Primeiro, a ligação de uma molécula de hormônio a uma molécula de

**TABELA 12-2** Algumas enzimas e outras proteínas reguladas por fosforilação dependente de cAMP (por PKA)

| Enzima/proteína | Sequência fosforilada* | Rota/processo regulado |
|---|---|---|
| Glicogênio-sintase | RASCTSSS | Síntese de glicogênio |
| Cinase da fosforilase *b* | | |
| subunidade $\alpha$ | VEFRRLSI | Degradação de glicogênio |
| subunidade $\beta$ | RTKRSGSV | Degradação de glicogênio |
| Piruvato-cinase (de fígado de rato) | GVLRRASVAZL | Glicólise |
| Complexo piruvato-desidrogenase (tipo L) | GYLRRASV | Piruvato a acetil-CoA |
| Lipase sensível a hormônio | PMRRSV | Mobilização de triacilgliceróis e oxidação de ácidos graxos |
| Fosfofrutocinase-2/frutose-2,6-bifosfatase | LQRRRGSSIPQ | Glicólise/gliconeogênese |
| Tirosina-hidroxilase | FIGRRQSL | Síntese de L-dopa, dopamina, noradrenalina e adrenalina |
| Histona H1 | AKRKASGPPVS | Condensação do DNA |
| Histona H2B | KKAKASRKESYSVYVYK | Condensação do DNA |
| Fosfolambano cardíaco (regulador da bomba cardíaca) | AIRRAST | $[Ca^{2+}]$ intracelular |
| Inibidor 1 da proteína-fosfatase-1 | IRRRRPTP | Desfosforilação de proteínas |
| Sequência consenso da PKA† | xR[RK]x[ST]B | Muitas |

*O resíduo de S ou T fosforilado está mostrado em vermelho. Todos os resíduos estão mostrados na abreviação de uma letra (ver Tabela 3-1).
† x é qualquer aminoácido; B é qualquer aminoácido hidrofóbico. Ver no Quadro 3-2 as convenções na descrição de sequências consenso.

receptor ativa cataliticamente muitas moléculas $G_s$ que se associam com o receptor ativado uma após a outra. Depois, pela ativação de uma molécula de adenilil-ciclase, cada molécula de $G_{s\alpha}$ estimula a síntese catalítica de *muitas* moléculas de cAMP. O segundo mensageiro cAMP, então, ativa a PKA, e cada molécula da enzima catalisa a fosforilação de *muitas* moléculas da proteína-alvo – a cinase da fosforilase *b* na Figura 12-7. Essa cinase ativa a glicogênio-fosforilase *b*, o que leva à rápida mobilização de glicose a partir de glicogênio. O efeito líquido da cascata é a amplificação do sinal hormonal em várias ordens de magnitude, o que justifica a necessidade de concentrações muito baixas de adrenalina (ou qualquer outro hormônio) para a atividade hormonal.

## Diversos mecanismos levam ao término da resposta $\beta$-adrenérgica

Para ser funcional, um sistema de transdução de sinal deve ser *desligado* após o término do estímulo pelo hormônio ou por outra molécula, e os mecanismos para a desativação do sinal são intrínsecos a todos os sistemas de sinalização. A maioria dos sistemas também se adapta à presença con-

**FIGURA 12-7 A cascata da adrenalina.** A adrenalina desencadeia uma série de reações nos hepatócitos, nas quais catalisadores ativam catalisadores, resultando em uma grande amplificação do sinal hormonal original. Os números de moléculas mostrados simplesmente ilustram a amplificação e são, quase certamente, meras estimativas. A ligação de uma molécula de adrenalina a um receptor $\beta$-adrenérgico ativa diversas (possivelmente centenas) de proteínas G, uma após a outra, e cada qual ativa uma molécula da enzima adenilil-ciclase. A adenilil-ciclase atua cataliticamente, produzindo muitas moléculas de cAMP para cada adenilil-ciclase ativada. (Como são necessárias duas moléculas de cAMP para ativar uma subunidade catalítica de PKA, esta etapa não amplifica o sinal.)

tínua do sinal por tornar-se menos sensível, no processo de dessensibilização. O sistema $\beta$-adrenérgico ilustra ambos. Quando a concentração de adrenalina na corrente sanguínea diminui, ficando menor que a da $K_d$ do receptor, o hormônio se dissocia do receptor e este reassume a conformação inativa, na qual não mais consegue ativar $G_s$.

Uma segunda maneira de extinguir a resposta ao estímulo $\beta$-adrenérgico é pela hidrólise do GTP ligado à subunidade $G_\alpha$, catalisada pela atividade GTPásica intrínseca da proteína G. A conversão do GTP ligado em GDP favorece o retorno de $G_\alpha$ à conformação na qual ela liga-se às subunidades $G_{\beta\gamma}$ – a conformação em que a proteína G é incapaz de interagir com a adenilil-ciclase ou estimulá-la. Isso encerra a produção de cAMP. A taxa de inativação de $G_s$ depende da atividade GTPásica, que é bastante fraca na subunidade $G_\alpha$ isolada. Entretanto, as proteínas ativadoras de GTPase (GAP) ativam fortemente essa atividade de GTPase, levando à inativação mais rápida da proteína G (ver Quadro 12-2). As próprias GAP podem ser reguladas por outros fatores, estabelecendo uma regulação mais precisa da resposta ao estímulo $\beta$-adrenérgico. Um terceiro mecanismo para o término da resposta é a remoção do segundo mensageiro: a hidrólise do cAMP a 5'-AMP (sem atividade como segundo mensageiro) pela **fosfodiesterase de nucleotídeo cíclico** (a cAMP-fosfodiesterase; Figura 12-4a, etapa ❼; 12-4b).

Por último, ao final da rota de sinalização, os efeitos metabólicos que resultam da fosforilação enzimática são revertidos pela ação de fosfoproteína-fosfatases, que hidrolisam resíduos de Ser, Thr ou Tyr fosforilados, liberando fosfato inorgânico ($P_i$). Cerca de 150 genes do genoma humano codificam para fosfoproteína-fosfatases, menos do que o número de genes que codificam proteínas-cinases (~500). Algumas dessas fosfatases são sabidamente reguladas; outras podem agir constitutivamente. Quando a [cAMP] diminui e a PKA retorna à forma inativa (etapa ❼ na Figura 12-4a), o equilíbrio entre fosforilação e desfosforilação é deslocado na direção da desfosforilação por essas fosfatases.

## O receptor $\beta$-adrenérgico é dessensibilizado pela fosforilação e pela associação com arrestina

Os mecanismos para o término da sinalização descritos anteriormente se iniciam com o término do estímulo. Um mecanismo diferente, a dessensibilização, suprime a resposta *mesmo enquanto o sinal persiste*. A dessensibilização do receptor $\beta$-adrenérgico é mediada por uma proteína-cinase que fosforila o receptor no domínio intracelular, que normalmente interage com $G_s$ (**Figura 12-8**). Quando o receptor é ocupado pela adrenalina, a **cinase do receptor $\beta$-adrenérgico**, ou **$\beta$ARK** (de *$\beta$-adrenergic receptor kinase*) (também chamada de **GRK2**; ver seguir), fosforila

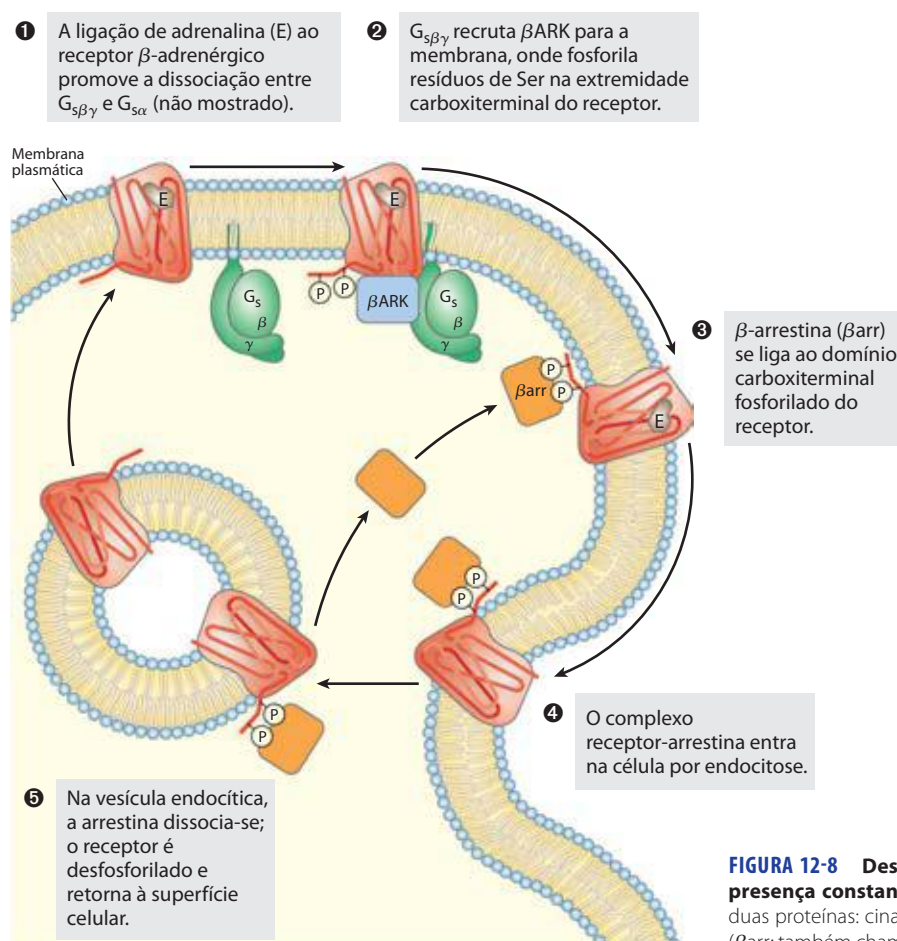



**FIGURA 12-8 Dessensibilização do receptor $\beta$-adrenérgico na presença constante de adrenalina.** Este processo é mediado por duas proteínas: cinase do receptor $\beta$-adrenérgico ($\beta$ARK) e $\beta$-arrestina ($\beta$arr; também chamada de arrestina-2).

alguns resíduos de Ser próximos à extremidade carboxiterminal do receptor, localizada na face citoplasmática da membrana plasmática. Geralmente situada no citosol, a $\beta$ARK é recrutada à membrana plasmática pela associação com as subunidades $G_{s\beta\gamma}$, estando assim posicionada para fosforilar o receptor. A fosforilação do receptor cria um sítio de ligação para a proteína **$\beta$-arrestina** ou **$\beta$arr** (também chamada de **arrestina-2**), e a ligação de $\beta$-arrestina impede de maneira eficiente a interação adicional entre o receptor e a proteína G. A ligação de $\beta$-arrestina também facilita o sequestro do receptor – a remoção das moléculas do receptor da membrana plasmática por endocitose em pequenas vesículas intracelulares. O complexo arrestina-receptor recruta duas proteínas envolvidas na formação de vesículas (ver Figura 27-45), o complexo AP-2 e a clatrina, que iniciam a invaginação da membrana, levando à formação de endossomos contendo o receptor adrenérgico. Nesse estado, os receptores não são acessíveis à adrenalina e são, portanto, inativos. Os receptores nessas vesículas endocíticas serão, por fim, desfosforilados e retornarão à membrana plasmática, completando o circuito e tornando o sistema novamente sensível à adrenalina. A cinase do receptor $\beta$-adrenérgico é um membro de uma família de **cinases dos receptores associados a proteínas G** (**GRK**, de *G protein-coupled receptor kinases*), e todas fosforilam GPCR nos domínios citoplasmáticos carboxiterminais e atuam similarmente à $\beta$ARK na dessensibilização e ressensibilização dos receptores. Pelo menos cinco GRK diferentes e quatro diferentes arrestinas são codificadas no genoma humano; cada GRK é capaz de dessensibilizar um subconjunto específico de GPCR, e cada arrestina pode interagir com muitos tipos diferentes de receptores fosforilados.

## O AMP cíclico age como segundo mensageiro para muitas moléculas reguladoras

A adrenalina é somente um de muitos hormônios, fatores de crescimento e outras moléculas reguladoras que atuam por alteração na [cAMP] intracelular e, desta maneira, na atividade da PKA (Tabela 12-3). Por exemplo, o glucagon se liga ao seu receptor na membrana plasmática dos adipócitos, ativando (via uma proteína $G_s$) a adenilil-ciclase. A PKA, estimulada pelo resultante aumento na [cAMP], fosforila e ativa duas proteínas essenciais para a mobilização dos ácidos graxos dos depósitos de gordura (ver Figura 17-3). Similarmente, o hormônio peptídico ACTH (hormônio adrenocorticotrópico, de *adrenocorticotropic hormone*, também chamado de corticotropina), produzido pela hipófise anterior, se liga a receptores específicos no córtex suprarrenal, ativando a adenilil-ciclase e elevando a [cAMP] intracelular. A PKA, então, fosforila e ativa diversas enzimas necessárias para a síntese de cortisol e outros hormônios esteroides. Em muitos tipos de células, a subunidade catalítica da PKA também pode transportar-se para dentro do núcleo, onde fosforila a **proteína de ligação do elemento de resposta a cAMP** (**CREB**, de *cAMP response element binding protein*), que altera a expressão de genes específicos regulados por cAMP.

Alguns hormônios agem por meio da *inibição* da adenilil-ciclase, desta maneira *reduzindo* a [cAMP] e *suprimindo* a fosforilação de proteínas. Por exemplo, a ligação da somatostatina ao seu receptor causa a ativação de uma **proteína G inibitória**, ou **$G_i$**, estruturalmente homóloga a $G_s$, que inibe a adenilil-ciclase e diminui a [cAMP]. A somatostatina, portanto, contrabalança os efeitos do glucagon. No tecido adiposo, a prostaglandina $E_1$ ($PGE_1$; ver Figura 10-18) inibe a adenilil-ciclase, reduzindo a [cAMP] e retardando a mobilização das reservas lipídicas iniciada por adrenalina e glucagon. Em outros tecidos, a $PGE_1$ estimula a síntese de cAMP: seus receptores estão acoplados à adenilil-ciclase por uma proteína G estimulatória, $G_s$. Nos tecidos com receptores $\alpha_2$-adrenérgicos, a adrenalina diminui a [cAMP]; nesse caso, os receptores estão acoplados à adenilil-ciclase por meio de uma proteína G inibitória, $G_i$. Em resumo, um sinal extracelular, como a adrenalina ou a $PGE_1$, pode ter efeitos completamente diferentes em diferentes tecidos ou tipos celulares, dependendo de três fatores: o tipo de receptor no tecido, o tipo de proteína G ($G_s$ ou $G_i$) ao qual o receptor está acoplado, e o conjunto de enzimas-alvo da PKA nas células. Somando as influências que tendem a aumentar e diminuir a [cAMP], a célula integra os sinais previamente mencionados como característica geral dos mecanismos de transdução de sinal (Figura 12-1e).

Outro fator que explica de que modo tantos sinais diferentes podem ser mediados por um único segundo mensageiro (cAMP) é a restrição dos processos de sinalização a regiões específicas da célula por meio das **proteínas adaptadoras** – proteínas não catalisadoras que agrupam outras moléculas de proteínas que agem em conjunto (descritas em mais detalhes a seguir). **AKAP** (de *A kinase anchoring proteins,* ou **proteínas de ancoragem da cinase**

**TABELA 12-3** Alguns sinais que utilizam cAMP como segundo mensageiro

| |
|---|
| Corticotropina (ACTH) |
| Hormônio liberador de corticotropina (CRH) |
| Dopamina [$D_1$, $D_2$] |
| Adrenalina ($\beta$-adrenérgico) |
| Hormônio folículo-estimulante (FSH) |
| Glucagon |
| Histamina [$H_2$] |
| Hormônio luteinizante (LH) |
| Hormônio estimulante de melanócitos (MSH) |
| Odorantes (muitos) |
| Hormônio da paratireoide |
| Prostaglandinas $E_1$, $E_2$ ($PGE_1$, $PGE_2$) |
| Serotonina [5-HT-1a, 5-HT-2] |
| Somatostatina |
| Moléculas de sabor (doce, amargo) |
| Hormônio estimulante da tireoide |

**Nota:** Subtipos dos receptores entre colchetes. Os subtipos podem ter diferentes mecanismos de transdução. Por exemplo, a serotonina é detectada em alguns tecidos por receptores dos subtipos 5-HT-1a e 5-HT-1b, que agem via adenilil-ciclase e cAMP, e em outros tecidos pelo receptor do subtipo 5-HT-1c, que age pelo mecanismo da fosfolipase C/$IP_3$ (ver Tabela 12-4).

**A**) são proteínas adaptadoras multivalentes; uma região da proteína se liga às subunidades R da PKA (ver Figura 12-6a) e outra a uma estrutura específica da célula, confinando a PKA à adjacência daquela estrutura. Por exemplo, AKAP específicas ligam PKA a microtúbulos, filamentos de actina, canais iônicos, mitocôndrias ou núcleo. Diferentes tipos celulares têm diferentes complementos de AKAP, de maneira que cAMP pode estimular a fosforilação de proteínas mitocondriais em uma célula e a fosforilação de filamentos de actina em outra. Em alguns casos, uma AKAP conecta a PKA à enzima que leva à ativação da PKA (adenilil-ciclase) ou que extingue a ação da PKA (cAMP-fosfodiesterase ou fosfoproteína-fosfatase) (**Figura 12-9**). A grande proximidade dessas enzimas de ativação e inativação presumivelmente desencadeia uma resposta muito breve e extremamente localizada.

É agora evidente que, para entender completamente a sinalização celular, pesquisadores necessitam de ferramentas suficientemente precisas para detectar e estudar os aspectos espaciais e temporais dos processos de sinalização no nível subcelular e em tempo real. Para os estudos da localização intracelular das variações bioquímicas, a bioquímica encontra a biologia celular, e as técnicas que cruzam esta fronteira têm se mostrado essenciais para a compreensão das rotas de sinalização. As sondas fluorescentes têm encontrado ampla aplicação nos estudos sobre sinalização. A marcação de proteínas funcionais com marcador fluorescente, como a proteína fluorescente verde (GFP, de *green fluorescent protein*), revela as localizações subcelulares (ver Figura 9-16c). As variações no estado de associação de duas proteínas (como as subunidades R e C da PKA) podem ser estimadas pela medida da transferência não radioativa de energia entre sondas fluorescentes ligadas a cada proteína, técnica chamada de transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET, de *fluorescence resonance energy transfer*; Quadro 12-3).

**FIGURA 12-9 A nucleação de complexos supramoleculares pelas proteínas de ancoragem da cinase A (AKAP).** A AKAP5 pertence a uma família de proteínas que atuam como arcabouços multivalentes, mantendo as subunidades catalíticas da PKA – por meio da interação da AKAP com as subunidades reguladoras da PKA – próximas a uma região ou estrutura celular específica. A AKAP5 é direcionada às balsas lipídicas na superfície citoplasmática da membrana plasmática por dois grupos palmitoil ligados covalentemente e por um sítio de ligação ao fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato ($PIP_3$). A AKAP5 também tem sítios de ligação para o receptor $\beta$-adrenérgico, adenilil-ciclase, PKA e uma fosfoproteína-fosfatase (PP2A), aproximando todas estas proteínas no plano da membrana. Quando a adrenalina liga-se ao receptor $\beta$-adrenérgico, $G_{s\alpha}$ induz a produção de cAMP pela adenilil-ciclase, que chega rapidamente e com muito pouca diluição até a PKA próxima. A PKA fosforila sua proteína-alvo, alterando sua atividade, até que a fosfoproteína-fosfatase remova o grupo fosfato e retorne a proteína-alvo ao seu estado pré-estímulo. As AKAP neste e em outros casos originam uma alta concentração local de enzimas e segundos mensageiros, de modo que o circuito de sinalização permanece extremamente localizado, e a duração do sinal é limitada.

## Diacilglicerol, inositol-trifosfato e $Ca^{2+}$ têm funções relacionadas como segundos mensageiros

Uma segunda ampla classe de GPCR se acopla por meio de uma proteína G a uma **fosfolipase C** (**PLC**) da membrana plasmática, a qual é específica para o fosfolipídeo de membrana fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato, ou $PIP_2$ (ver Figura 10-16). Quando um dos hormônios que agem por esse mecanismo (Tabela 12-4) liga-se ao receptor específico na membrana plasmática (**Figura 12-10**, etapa ❶), o complexo receptor-hormônio catalisa a troca de GDP por GTP em uma proteína G associada, $\mathbf{G_q}$ (etapa ❷), ativando-a de maneira muito semelhante à ativação de $G_s$ pelo receptor adrenérgico (Figura 12-4). A proteína $G_q$ ativada ativa a PLC específica para $PIP_2$ (Figura 12-10, etapa ❸), que catalisa (etapa ❹) a produção de dois potentes segundos mensageiros, **diacilglicerol** e **inositol-1,4,5-trifosfato**, ou $\mathbf{IP_3}$ (não o confunda com $PIP_3$, p. 456).

**TABELA 12-4** Alguns sinais que atuam por meio de fosfolipase C, $IP_3$ e $Ca^{2+}$

| | | |
|---|---|---|
| Acetilcolina [muscarínico $M_1$] | Peptídeo liberador de gastrina | Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) |
| Agonistas $\alpha_1$-adrenérgicos | Glutamato | Serotonina [5-HT-1c] |
| Angiogenina | Hormônio liberador de gonadotropina (GRH) | Hormônio liberador de tireotropina (TRH) |
| Angiotensina II | Histamina [$H_1$] | Hormônio antidiurético |
| ATP [$P_{2x}$, $P_{2y}$] | Luz (*Drosophila*) | |
| Auxina | Ocitocina | |

**Nota:** Subtipos dos receptores estão entre colchetes; ver nota de rodapé da Tabela 12-3.

## QUADRO 12-3 MÉTODOS FRET: a bioquímica vista em uma célula viva

As sondas fluorescentes são comumente utilizadas para a rápida detecção de variações biológicas em células vivas isoladas. Elas podem ser desenvolvidas de modo a informarem quase que instantaneamente (dentro de nanossegundos) as variações nas concentrações celulares de um segundo mensageiro ou na atividade de uma proteína-cinase. Além disso, a microscopia de fluorescência apresenta resolução suficiente para revelar em qual local da célula tais alterações estão acontecendo. Em um procedimento muito utilizado, as sondas fluorescentes são derivadas de uma proteína fluorescente que ocorre naturalmente, a **proteína fluorescente verde** (**GFP**) da água-viva *Aequorea victoria* (Figura Q-1).

Quando excitada pela absorção de um fóton de luz, a GFP emite um fóton (isto é, fluoresce) na região do verde do espectro. O centro de absorção/emissão de luz da GFP (seu cromóforo) é constituído por uma forma oxidada do tripeptídeo -$Ser^{65}$-$Tyr^{66}$-$Gly^{67}$(Figura Q-2). A oxidação do tripeptídeo é catalisada pela própria proteína GFP (Figura Q-3), de maneira que é possível clonar essa proteína em praticamente qualquer célula, onde ela pode agir como um marcador fluorescente para qualquer proteína à qual ela esteja fusionada (ver Figura 9-18). Variantes da GFP, com diferentes espectros de fluorescência, são gerados por engenharia genética. Por exemplo, na proteína fluorescente amarela (YFP, de *yellow fluorescent protein*), a $Ala^{206}$ da GFP é substituída por um resíduo de Lys, alterando o comprimento de onda de absorção da luz e a fluorescência. Outras variantes da GFP têm fluorescência azul (BFP) ou ciano (CFP), e uma proteína relacionada tem fluorescência vermelha (mRFP1) (Figura Q-4). A GFP e suas variantes são estruturas compactas que mantêm a capacidade de se dobrar se na conformação nativa em barril $\beta$ mesmo quando fusionadas a outra proteína. Essas proteínas híbridas agem como réguas espectroscópicas para estimar as distâncias entre proteínas

**FIGURA Q-1** *Aequorea victoria*, água-viva abundante na região de Puget Sound, no Estado de Washington, EUA.

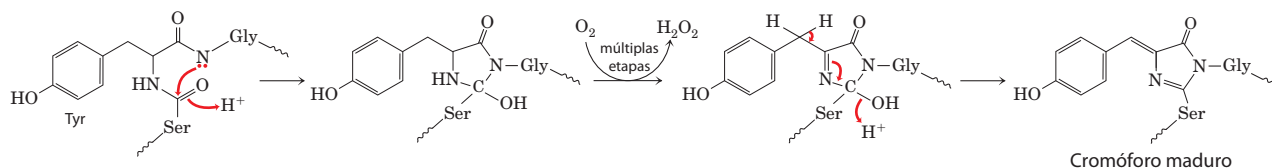
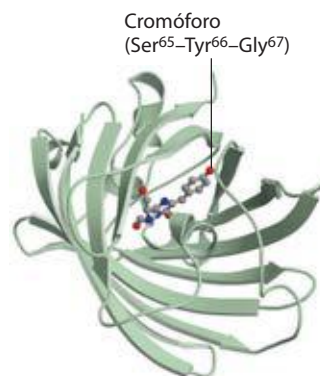



**FIGURA Q-2** A proteína fluorescente verde (GFP), com o cromóforo fluorescente representado na forma de esfera e bastão (derivado da estrutura 1GFL do PDB).

que interagem dentro da célula e, indiretamente, para estimar as concentrações locais de compostos que alterem as distâncias entre duas proteínas.

Uma molécula fluorescente excitada, como a GFP ou a YFP, pode gastar a energia do fóton absorvido de duas maneiras: (1) por fluorescência, emitindo um fóton com comprimento de onda levemente maior (menor energia) do que o da luz excitante, ou (2) por **transferência de energia por ressonância de fluorescência** (**FRET**), na qual a energia da molécula excitada (o doador) passa diretamente a uma molécula próxima (o aceptor) *sem a emissão de um fóton*, excitando o aceptor (Figura Q-5). O aceptor pode, então, decair ao estado fundamental por fluorescência; o fóton emitido tem um comprimento de onda maior (menor energia) do que o da luz excitante original e a emissão fluorescente do doador. Esse segundo modo de decaimento (FRET) é possível apenas quando doador e aceptor estão próximos um do outro (dentro de 1 a 50 Å); a eficiência da FRET é inversamente proporcional à *sexta potência* da distância entre doador e aceptor. Portanto, variações muito pequenas na distância entre doador e aceptor são registradas como variações muito grandes na FRET, medida como a fluorescência emitida pela molécula aceptora quando o doador é excitado. Com detectores de luz suficientemente sensíveis, este sinal fluorescente pode ser localizado em regiões específicas de uma célula viva isolada.

A FRET tem sido utilizada para medir a [cAMP] em células vivas. O gene da GFP é fusionado com aquele da subunidade reguladora (R) da proteína-cinase dependente de cAMP (PKA), e o gene da BFP é fusionado àquele da subunidade catalítica (C) (Figura Q-6). Quando essas duas proteínas híbridas são expressas em uma célula, a BFP (doador; excitação a 380 nm, emissão a 460

Tyr, Ser, Gly, HN, HO, $H^+$, $O_2$, $H_2O_2$, múltiplas etapas, OH, N–Gly

Cromóforo maduro

**FIGURA Q-3** O cromóforo da GFP é derivado de uma série de três aminoácidos: -$Ser^{65}$-$Tyr^{66}$-$Gly^{67}$-. A maturação do cromóforo envolve um rearranjo interno, acoplado a uma reação de oxidação que ocorre em múltiplas etapas. Um mecanismo resumido está mostrado aqui.

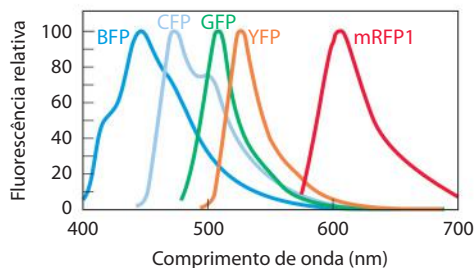



**FIGURA Q-4** Espectro de emissão das variantes da GFP.

nm) e a GFP (aceptor; excitação a 475 nm, emissão a 545 nm) estão suficientemente próximas na PKA inativa (tetrâmero $R_2C_2$) para ocasionarem FRET. Sempre que a [cAMP] celular aumenta, o complexo $R_2C_2$ se dissocia em $R_2$ e 2C, e o sinal da FRET é perdido, pois o doador e o aceptor estão agora muito distantes para uma FRET eficiente. Vista sob um microscópio de fluorescência, a região de [cAMP] mais alta apresenta um sinal da GFP mínimo e um sinal da BFP mais alto. A medida da razão entre a emissão a 460 nm e a 545 nm fornece uma medida sensível da variação na [cAMP]. Determinando essa razão em todas as regiões da célula, os pesquisadores produzem uma falsa imagem colorida da célula, na qual a razão, ou a [cAMP] relativa, está representada pela intensidade da cor. As imagens gravadas em intervalos de tempo revelam as variações na [cAMP] ao longo do tempo.

Uma variação dessa tecnologia tem sido utilizada para medir a atividade da PKA em uma célula viva (Figura Q-7). Os pesquisadores criaram um alvo para a fosforilação pela PKA por meio da síntese de uma proteína híbrida que contém quatro elementos: YFP (aceptor); um peptídeo curto com um resíduo de Ⓟ-Ser circundado pela sequência consenso da PKA; um domínio de ligação a Ⓟ-Ser (chamado de 14-3-3); e CFP (doador). Quando o resíduo de Ser não está fosforilado, o domínio 14-3-3 não tem afinidade por ele, e a proteína híbrida existe em uma forma estendida, com o doador e o aceptor muito afastados para a geração de um sinal da FRET. Sempre que a PKA estiver ativa dentro da célula, o resíduo de Ser da proteína híbrida será fosforilado, e o domínio 14-3-3 se ligará a Ser. Desta maneira, YFP e CFP se aproximam, e um sinal da FRET pode ser detectado com um microscópio de fluorescência, revelando a presença da PKA ativa.

**FIGURA Q-6** Medida da [cAMP] com FRET. A fusão de genes cria proteínas híbridas que exibem FRET quando as subunidades reguladora (R) e catalítica (C) da PKA estão associadas (baixa [cAMP]). Quando a [cAMP] aumenta, as subunidades se dissociam e a FRET cessa. A razão entre a emissão a 460 nm (subunidades dissociadas) e 545 nm (subunidades complexadas), portanto, fornece uma medida sensível da [cAMP].

**FIGURA Q-5** Quando a proteína doadora (CFP) é excitada com luz monocromática com comprimento de onda de 433 nm, ela emite luz fluorescente de 476 nm (à esquerda). Quando a proteína (em vermelho) fusionada a CFP e a proteína (em roxo) fusionada a YFP interagem, a CFP e a YFP ficam suficientemente próximas para permitir a transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) entre elas. Agora, quando a CFP absorve luz de 433 nm, em vez de fluorescer a 476 nm, ela transfere a energia diretamente para a YFP, que, então, fluoresce em seu comprimento de onda de emissão característico, 527 nm. A razão entre a emissão de luz de 527 e 476 nm é, portanto, uma medida da interação entre as proteínas vermelha e a roxa.

**FIGURA Q-7** Medida da atividade da PKA com FRET. Uma proteína produzida por engenharia genética une YFP e CFP por meio de um peptídeo que contém um resíduo de Ser circundado pela sequência consenso para fosforilação pela PKA, e o domínio 14-3-3 de ligação a Ⓟ-Ser. A PKA ativada fosforila o resíduo de Ser, que se associa com o domínio de ligação 14-3-3, aproximando as proteínas fluorescentes suficientemente para permitir a ocorrência da FRET, e revelando a presença de PKA ativa.

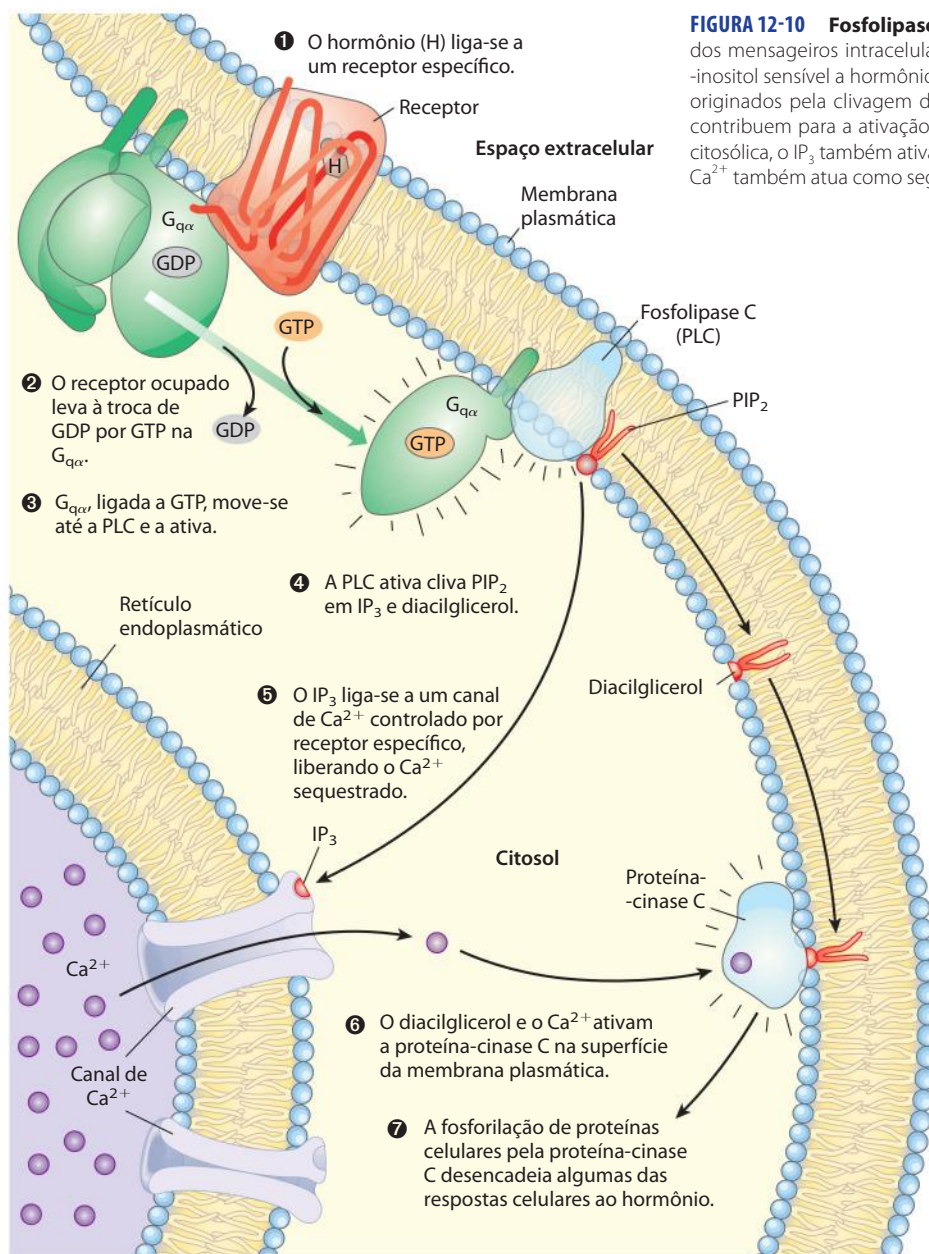
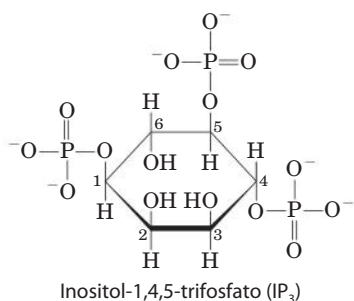



**FIGURA 12-10 Fosfolipase C e $IP_3$ ativadas por hormônio.** Dois segundos mensageiros intracelulares são produzidos pelo sistema de fosfatidil-inositol sensível a hormônio: inositol-1,4,5-trifosfato ($IP_3$) e diacilglicerol são originados pela clivagem do fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato ($PIP_2$). Ambos contribuem para a ativação da proteína-cinase C. Pelo aumento da [$Ca^{2+}$] citosólica, o $IP_3$ também ativa outras enzimas dependentes de $Ca^{2+}$; assim, o $Ca^{2+}$ também atua como segundo mensageiro.

Inositol-1,4,5-trifosfato ($IP_3$)

O inositol-trifosfato, composto solúvel em água, difunde-se da membrana plasmática para o retículo endoplasmático (RE), onde se liga a canais de $Ca^{2+}$ específicos controlados por $IP_3$, abrindo-os. A ação da bomba SERCA (ver p. 410) assegura que a [$Ca^{2+}$] no RE permaneça várias ordens de magnitude mais alta do que a concentração citosólica, de modo que, quando esses canais de $Ca^{2+}$ são abertos, o $Ca^{2+}$ flui para o citosol (Figura 12-10, etapa ❺) e a [$Ca^{2+}$] citosólica rapidamente aumenta para aproximadamente $10^{-6}$ M. Uma consequência da [$Ca^{2+}$] elevada é a ativação da **proteína-cinase C** (**PKC**). O diacilglicerol atua em conjunto com o $Ca^{2+}$ para a ativação da PKC, e, portanto, o $Ca^{2+}$ também age como segundo mensageiro (etapa ❻). A ativação envolve o afastamento de um domínio da PKC (o domínio do pseudossubstrato) de sua posição na região de ligação ao substrato da enzima, possibilitando que a enzima se ligue e fosforile as proteínas que contenham uma sequência consenso da PKC – resíduos de Ser ou Thr inseridos em uma sequência de aminoácidos reconhecida pela PKC (etapa ❼). Existem diversas isoenzimas da PKC, cada uma com distribuição tecidual, especificidade para a proteína-alvo e função características. Seus alvos incluem proteínas do citoesqueleto, enzimas e proteínas nucleares que regulam

a expressão gênica. Em conjunto, esta família de enzimas desempenha uma ampla variedade de ações na célula, afetando, por exemplo, a função neuronal e imunológica, e a regulação da divisão celular.

## O cálcio é um segundo mensageiro que pode ser localizado no tempo e no espaço

Existem muitas variações do esquema básico de sinalização pelo $Ca^{2+}$. Em muitos tipos de células que respondem a sinais extracelulares, o $Ca^{2+}$ age como um segundo mensageiro que inicia respostas intracelulares, como a exocitose nos neurônios e nas células endócrinas, a contração nos músculos, e os rearranjos do citoesqueleto durante o movimento ameboide. Nas células não estimuladas, a $[Ca^{2+}]$ citosólica é mantida muito baixa ($<10^{-7}$ M) por meio da ação de bombas de $Ca^{2+}$ localizadas no RE, na mitocôndria e na membrana plasmática (como discutido em mais detalhes a seguir). Estímulos hormonais, neurais ou outros estímulos causam o influxo de $Ca^{2+}$ para dentro da célula por meio de canais de $Ca^{2+}$ específicos da membrana plasmática, ou causam a liberação do $Ca^{2+}$ sequestrado no RE ou na mitocôndria elevando, em qualquer um dos casos, a $[Ca^{2+}]$ citosólica e iniciando uma resposta celular.

Variações na $[Ca^{2+}]$ intracelular são detectadas por proteínas ligantes de $Ca^{2+}$ que regulam uma grande variedade de enzimas dependentes de $Ca^{2+}$. A **calmodulina** (**CaM**; $M_r$ 17.000) é uma proteína ácida com quatro sítios de ligação a $Ca^{2+}$ de alta afinidade. Quando a $[Ca^{2+}]$ intracelular aumenta para cerca de $10^{-6}$ M (1 μM), a ligação do $Ca^{2+}$ à calmodulina leva a mudanças na conformação da proteína (**Figura 12-11a**). A calmodulina se associa com diversas proteínas e, no estado ligado ao $Ca^{2+}$, modula suas atividades (Figura 12-11b). Ela é um membro de uma família de proteínas de ligação ao $Ca^{2+}$ que também inclui a troponina (ver Figura 5-32), que inicia a contração do músculo esquelético em resposta à elevação na $[Ca^{2+}]$. Essa família apresenta em comum uma estrutura de ligação ao $Ca^{2+}$, a mão EF (Figura 12-11c).

A calmodulina é uma subunidade integral das **proteínas-cinases dependentes de $Ca^{2+}$/calmodulina** (**CaM-cinases**, dos tipos I a IV). Quando a $[Ca^{2+}]$ intracelular aumenta em resposta a um estímulo, a calmodulina se liga ao $Ca^{2+}$, sofre uma mudança na conformação e ativa a CaM-cinase. A cinase, então, fosforila enzimas-alvo, regulando suas atividades. A calmodulina também é uma subunidade de regulação da cinase da fosforilase *b* do músculo, ativada por $Ca^{2+}$. Desse modo, o $Ca^{2+}$ inicia as contrações musculares que requerem ATP ao mesmo tempo em que ativa a degradação do glicogênio, fornecendo o combustível para a síntese de ATP. Muitas outras enzimas também são moduladas pelo $Ca^{2+}$ por meio da calmodulina (Tabela 12-5). A atividade do segundo mensageiro $Ca^{2+}$, assim como a do cAMP, pode ser espacialmente restrita; depois que sua liberação inicia uma resposta local, o $Ca^{2+}$ geralmente é removido antes que possa difundir-se para regiões mais distantes da célula.

Com muita frequência, o nível de $Ca^{2+}$ não apenas aumenta e então diminui, mas, em vez disso, oscila durante um período de alguns segundos (**Figura 12-12**) – ainda que a concentração extracelular do hormônio que desencadeia a resposta permaneça constante. O mecanismo que origina as

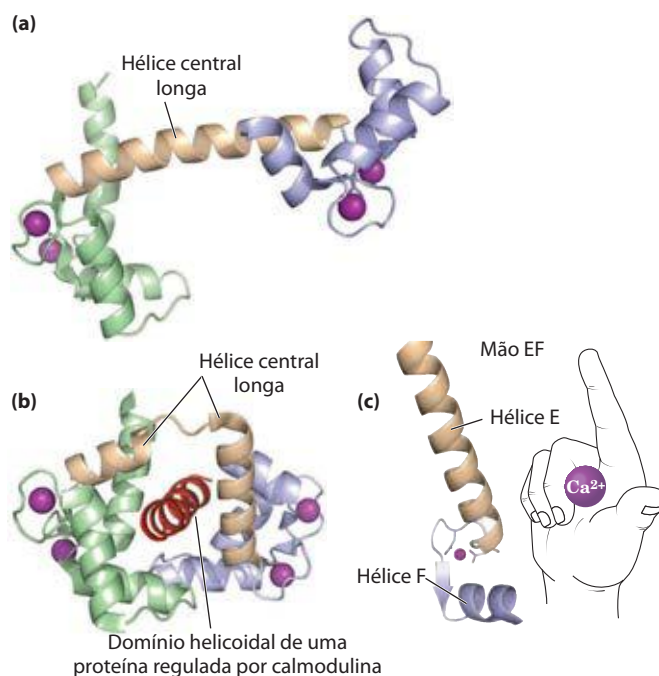



**FIGURA 12-11 Calmodulina.** A calmodulina, proteína mediadora de muitas reações enzimáticas estimuladas pelo $Ca^{2+}$, tem quatro sítios de ligação ao $Ca^{2+}$ de alta afinidade ($K_d \approx$ 0,1 a 1 μM). **(a)** Modelo em fitas da estrutura cristalográfica da calmodulina (PDB ID 1CLL). Os quatro sítios de ligação ao $Ca^{2+}$ estão ocupados pelo íon (em roxo). O domínio aminoterminal está à esquerda; o domínio carboxiterminal está à direita. **(b)** A calmodulina associada ao domínio helicoidal (em vermelho) da proteína-cinase dependente de calmodulina II, uma das muitas enzimas que ela regula (PDB ID 1CDL). Observe que a longa hélice $\alpha$ central da calmodulina, visível em (a), dobra-se para trás com a ligação do domínio helicoidal do substrato. A hélice central da calmodulina é claramente mais flexível em solução do que no cristal. **(c)** Cada um dos quatro sítios de ligação ao $Ca^{2+}$ ocorre em um motivo hélice-alça-hélice chamado de mão EF, também encontrado em muitas outras proteínas de ligação ao $Ca^{2+}$.

**TABELA 12-5** Algumas proteínas reguladas por $Ca^{2+}$ e calmodulina

| |
|---|
| Adenilil-ciclase (cérebro) |
| Proteínas-cinases dependentes de $Ca^{2+}$/calmodulina (CaM-cinases I a IV) |
| Canal de $Na^+$ dependente de $Ca^{2+}$ (*Paramecium*) |
| Canal de liberação de $Ca^{2+}$ do retículo sarcoplasmático |
| Calcineurina (fosfoproteína-fosfatase 2B) |
| cAMP-fosfodiesterase |
| Canal olfativo regulado por cAMP |
| Canais de $Ca^{2+}$ e $Na^+$ regulados por cGMP (cones e bastonetes) |
| Glutamato-descarboxilase |
| Cinases da cadeia leve da miosina |
| $NAD^+$-cinase |
| Óxido nítrico-sintase |
| Fosfatidil-inositol-3-cinase |
| ATPase de $Ca^{2+}$ da membrana plasmática (bomba de $Ca^{2+}$) |
| RNA-helicase (p68) |

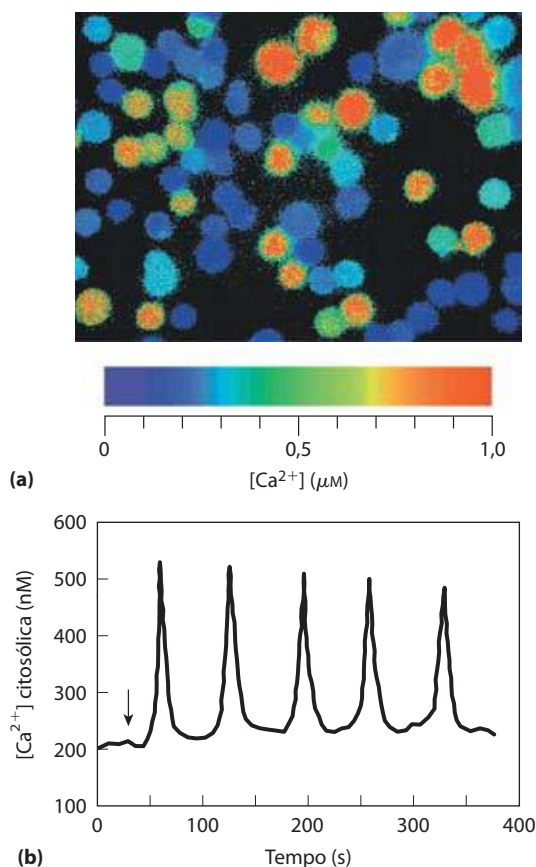



**FIGURA 12-12 O desencadeamento das oscilações na $[Ca^{2+}]$ intracelular por sinais extracelulares. (a)** Um corante (fura) que mostra alterações na fluorescência quando se liga ao $Ca^{2+}$ difunde-se para dentro das células, e a emissão de luz instantânea é medida por microscopia de fluorescência. A intensidade da fluorescência está representada por cores; a escala de cores relaciona a intensidade da cor com a $[Ca^{2+}]$, permitindo a determinação da $[Ca^{2+}]$ absoluta. Neste caso, timócitos (células do timo) foram estimulados com ATP extracelular, o que eleva a $[Ca^{2+}]$ intracelular. A resposta das células é heterogênea; algumas apresentam $[Ca^{2+}]$ intracelular alta (em vermelho), e outras, muito mais baixa (em azul). **(b)** Quando uma sonda como esta é utilizada em um único hepatócito, o agonista noradrenalina (cuja adição está marcada pela seta) causa oscilações na $[Ca^{2+}]$ de 200 a 500 nM. Oscilações similares são induzidas em outros tipos celulares por outros sinais extracelulares.

oscilações na $[Ca^{2+}]$ presumivelmente envolve a regulação por retroalimentação pelo $Ca^{2+}$ em alguma parte do processo de liberação de $Ca^{2+}$. Qualquer que seja o mecanismo, o efeito é que um tipo de sinal (concentração de hormônio, por exemplo) é convertido em outro (frequência e amplitude de "picos" de $[Ca^{2+}]$ intracelular). O sinal do $Ca^{2+}$ decresce conforme o íon se difunde para longe da fonte inicial (canal de $Ca^{2+}$), é sequestrado no RE ou é bombeado para fora da célula.

Existe uma interconexão significativa entre os sistemas de sinalização do $Ca^{2+}$ e do cAMP. Em alguns tecidos, tanto a enzima que produz cAMP (adenilil-ciclase) quanto a enzima que degrada cAMP (fosfodiesterose) são estimuladas por $Ca^{2+}$. Variações espaciais e temporais na $[Ca^{2+}]$ podem, portanto, produzir variações transitórias e localizadas na [cAMP]. Anteriormente foi mencionado que a PKA, a enzima que responde ao cAMP, frequentemente é parte de um complexo supramolecular altamente localizado agrupado sobre proteínas de ancoragem, como as AKAP. Essa localização subcelular das enzimas-alvo, combinada aos gradientes espaciais e temporais nas $[Ca^{2+}]$ e [cAMP], permite que a célula responda a diferentes sinais por meio de variações metabólicas sutis, localizadas no tempo e no espaço.

## Os GPCR são responsáveis por mediar as ações de uma ampla variedade de sinais

O genoma humano codifica aproximadamente 1.000 receptores acoplados a proteínas G, reconhecíveis por seus sete segmentos transmembrana helicoidais e por determinados resíduos altamente conservados. Cada um desses é seletivamente expresso, em determinados tipos celulares ou sob determinadas condições. Juntos, eles permitem que as células e tecidos respondam a uma ampla gama de estímulos diferentes, incluindo diversas aminas de baixa massa molecular, peptídeos, proteínas, eicosanoides e outros lipídeos, assim como luz e compostos detectados pelo olfato e gustação. A determinação das estruturas de vários GPCR por cristalografia (**Figura 12-13**), incluindo o receptor β-adrenérgico com sua proteína G, e o receptor de histamina, tem gerado grande interesse tanto a respeito do(s) mecanismo(s) de transdução quanto a respeito das possibilidades de alterar as atividades desses receptores com fármacos. Esses dois receptores são os alvos de uma variedade de amplamente utilizados betabloqueadores e anti-histamínicos, respectivamente. As semelhanças nas estruturas dos GPCR vão além do padrão com sete hélices transmembrana comum; as estruturas de cinco GPCR diferentes são quase sobreponíveis (Figura 12-13c). Claramente, algum fator na sua estrutura tridimensional os torna transdutores eficazes para muitos sinais diferentes.

### RESUMO 12.2 Receptores associados a proteínas G e segundos mensageiros

- Receptores associados a proteínas G (GPCR) compartilham um arranjo estrutural comum com sete hélices transmembrana e agem por meio de proteínas G heterotriméricas. Após a interação com o ligante, os GPCR catalisam a troca de GDP por GTP na proteína G, causando a dissociação da subunidade $G_\alpha$; a subunidade $G_\alpha$, então, estimula ou inibe a atividade de uma enzima efetora, afetando o nível do segundo mensageiro produzido.
- O receptor β-adrenérgico ativa uma proteína G estimulatória, $G_s$, ativando a adenilil-ciclase e elevando a concentração do segundo mensageiro cAMP. O cAMP estimula a fosforilação de enzimas-alvo importantes pela proteína-cinase dependente de cAMP, alterando suas atividades.
- Cascatas enzimáticas, nas quais uma única molécula de hormônio ativa um catalisador, que ativa outro catalisador, e assim por diante, resultam em uma grande amplificação do sinal, o que é característico dos sistemas de receptores de hormônios.
- A concentração de cAMP é, ao final, reduzida pela cAMP-fosfodiesterase, e a proteína $G_s$ desliga a si mesma pela hidrólise do GTP ligado a GDP, funcionando como um comutador binário autolimitante.

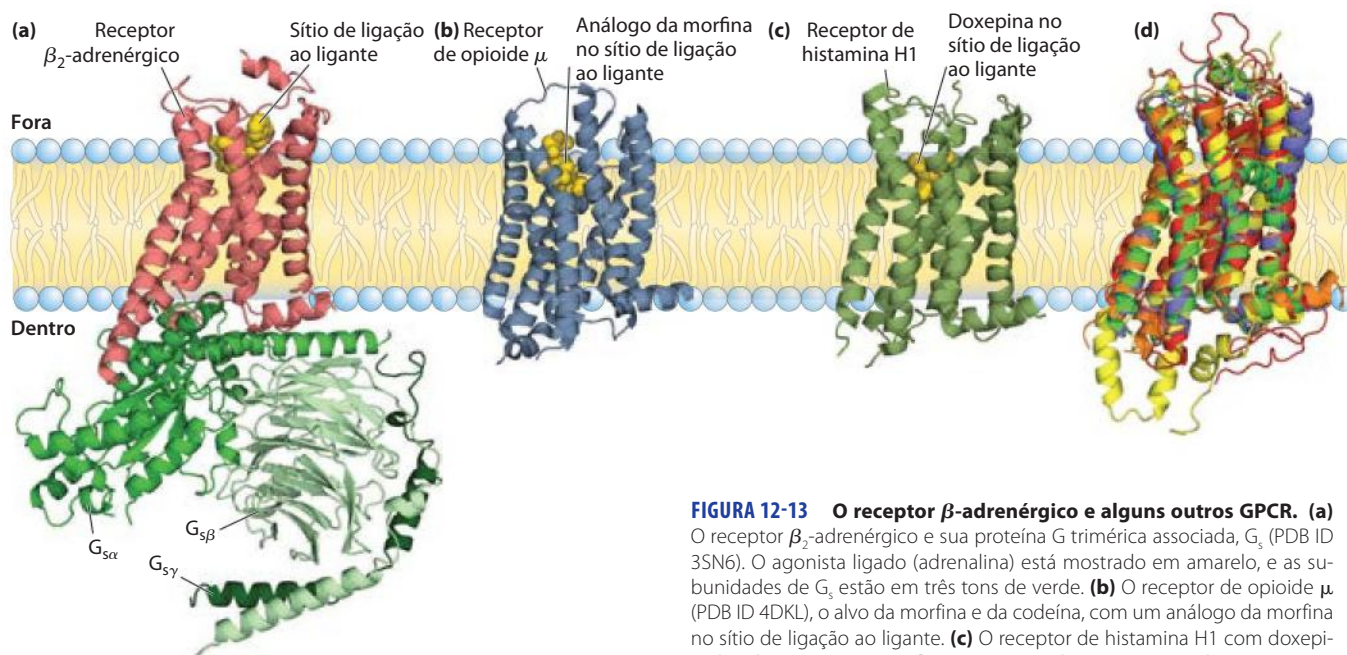



**FIGURA 12-13 O receptor $\beta$-adrenérgico e alguns outros GPCR. (a)** O receptor $\beta_2$-adrenérgico e sua proteína G trimérica associada, $G_s$ (PDB ID 3SN6). O agonista ligado (adrenalina) está mostrado em amarelo, e as subunidades de $G_s$ estão em três tons de verde. **(b)** O receptor de opioide $\mu$ (PDB ID 4DKL), o alvo da morfina e da codeína, com um análogo da morfina no sítio de ligação ao ligante. **(c)** O receptor de histamina H1 com doxepina ligada (PDB ID 3RZE). **(d)** As estruturas de cinco GPCR sobrepostas para mostrar a extraordinária conservação da estrutura. Estão mostrados o receptor de adenosina A2A humano (em cor de laranja; PDB ID 3EML), o receptor $\beta_1$-adrenérgico de peru (em azul; PDB ID 2VT4), o receptor $\beta_2$-adrenérgico humano (em verde; PDB ID 2RH1), a rodopsina de lula (em amarelo; PDB ID 2Z73) e a rodopsina bovina (em vermelho; PDB ID 1U19).

- Quando o sinal da adrenalina persiste, a proteína-cinase específica para o receptor $\beta$-adrenérgico e a $\beta$-arrestina dessensibilizam temporariamente o receptor e levam à sua internalização em vesículas intracelulares.
- Alguns receptores estimulam a adenilil-ciclase por meio de $G_s$; outros a inibem por meio de $G_i$. Portanto, a [cAMP] celular reflete a entrada integrada de dois (ou mais) sinais.
- Proteínas adaptadoras não catalisadoras, como as AKAP, aproximam as proteínas envolvidas em um processo de sinalização, aumentando a eficiência de suas interações e, em alguns casos, confinando o processo a uma localização subcelular específica.
- Alguns GPCR atuam por meio de uma fosfolipase C da membrana plasmática que cliva $PIP_2$ em diacilglicerol e $IP_3$. Pela abertura de canais de $Ca^{2+}$ no retículo endoplasmático, o $IP_3$ eleva a $[Ca^{2+}]$ intracelular. O diacilglicerol e o $Ca^{2+}$ agem em conjunto para ativar a proteína-cinase C, a qual fosforila proteínas celulares específicas e, assim, modula suas atividades. A $[Ca^{2+}]$ também regula (frequentemente via calmodulina) muitas outras enzimas e proteínas envolvidas em secreção, rearranjos do citoesqueleto, ou contrações.

## 12.3 Receptores tirosina-cinases

Os **receptores tirosina-cinases** (**RTK**, de *receptor tyrosine kinases*), uma grande família de receptores da membrana plasmática com atividade cinásica intrínseca, transduzem os sinais extracelulares por um mecanismo fundamentalmente diferente daquele dos GPCR. Os RTK têm um domínio de interação com o ligante na face extracelular da membrana plasmática e um sítio ativo enzimático na face citoplasmática, conectados por um único segmento transmembrana. O domínio citoplasmático é uma proteína-cinase que fosforila resíduos de Tyr em proteínas-alvo específicas – uma tirosina-cinase. Os receptores da insulina e do fator de crescimento da epiderme são os protótipos desse grupo.

### A estimulação do receptor de insulina desencadeia uma cascata de reações de fosforilação de proteínas

A insulina regula tanto as enzimas do metabolismo quanto a expressão gênica. Ela não entra nas células, mas inicia um sinal que viaja, por uma rota ramificada, desde o receptor na membrana plasmática até as enzimas sensíveis à insulina no citosol e também até o núcleo, onde estimula a transcrição de genes específicos. O receptor proteico de insulina (INSR, de *insulin receptor*) ativo é constituído por duas subunidades $\alpha$ idênticas, que se projetam para fora da face externa da membrana plasmática, e por duas subunidades $\beta$ transmembrana, com as regiões carboxiterminais projetando-se para dentro do citosol – um dímero de monômeros $\alpha\beta$ (**Figura 12-14**). As subunidades $\alpha$ contêm o domínio de ligação à insulina, e os domínios intracelulares das subunidades $\beta$ contêm a atividade proteína-cinásica que transfere um grupo fosfato do ATP para o grupo hidroxil de resíduos de Tyr em proteínas-alvo específicas. A sinalização por meio do INSR é iniciada quando a ligação de uma molécula de insulina entre as duas subunidades do dímero ativa a atividade Tyr-cinásica, e cada subunidade $\beta$ fosforila três resíduos de Tyr críticos próximos ao carboxiterminal da outra subunidade $\beta$ no dímero $(\alpha\beta)_2$. Essa **autofosforilação** expõe o sítio ativo da enzima, para que ela possa fosforilar os resíduos de Tyr em outras proteínas-alvo. O mecanismo de ativação da proteína-cinase do INSR é similar àquele descrito para PKA e PKC: uma região do domínio citoplasmático (sequência autoinibitória), que geralmente oclui o sítio

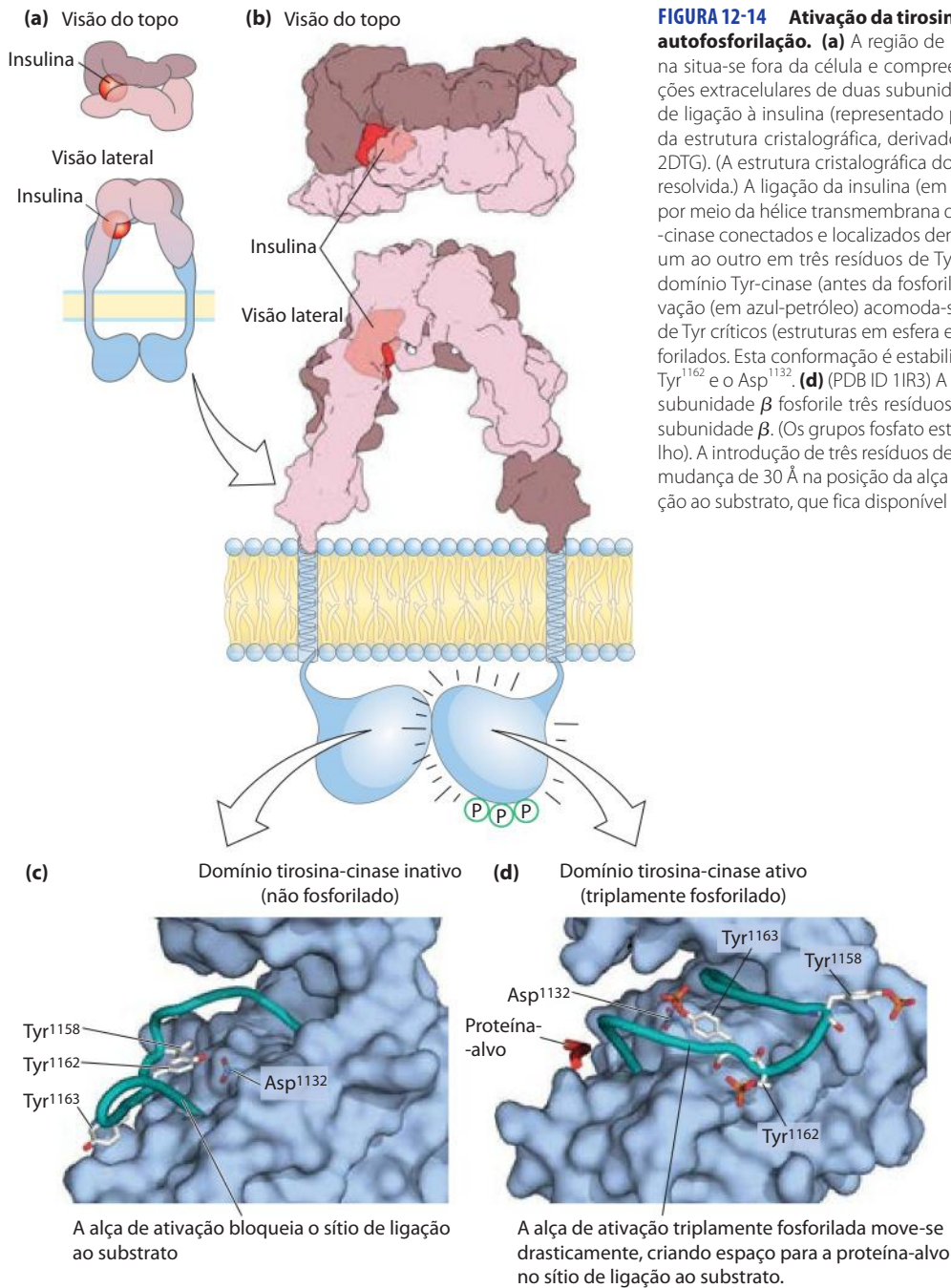



**FIGURA 12-14 Ativação da tirosina-cinase do receptor de insulina por autofosforilação. (a)** A região de ligação à insulina do receptor de insulina situa-se fora da célula e compreende **(b)** duas subunidades $\alpha$ e as porções extracelulares de duas subunidades $\beta$, entrelaçadas para formar o sítio de ligação à insulina (representado pelo modelo de contorno da superfície da estrutura cristalográfica, derivado da estrutura com identidade no PDB 2DTG). (A estrutura cristalográfica do domínio transmembrana ainda não foi resolvida.) A ligação da insulina (em vermelho; PDB ID 2CEU) é comunicada, por meio da hélice transmembrana de cada subunidade $\beta$, aos domínios Tyr--cinase conectados e localizados dentro da célula, ativando-os a fosforilarem um ao outro em três resíduos de Tyr. **(c)** (PDB ID 1IRK) Na forma inativa do domínio Tyr-cinase (antes da fosforilação dos resíduos de Tyr), a alça de ativação (em azul-petróleo) acomoda-se no sítio ativo, e nenhum dos resíduos de Tyr críticos (estruturas em esfera e bastão em branco e vermelho) são fosforilados. Esta conformação é estabilizada por ligações de hidrogênio entre a $Tyr^{1162}$ e o $Asp^{1132}$. **(d)** (PDB ID 1IR3) A ativação da Tyr-cinase permite que cada subunidade $\beta$ fosforile três resíduos de Tyr ($Tyr^{1158}$, $Tyr^{1162}$ e $Tyr^{1163}$) na outra subunidade $\beta$. (Os grupos fosfato estão ilustrados em cor de laranja e vermelho). A introdução de três resíduos de Ⓟ-Tyr altamente carregados força uma mudança de 30 Å na posição da alça de ativação, afastando-a do sítio de ligação ao substrato, que fica disponível para ligar e fosforilar uma proteína-alvo.

ativo, afasta-se do sítio ativo após ser fosforilada, abrindo o sítio para a ligação de proteínas-alvo (Figura 12-14).

Quando o INSR é autofosforilado (**Figura 12-15**, etapa ❶), um de seus alvos é o substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1, de *insulin receptor substrate-1*; etapa ❷). Uma vez fosforilado em alguns de seus resíduos de Tyr, o IRS-1 torna--se o ponto de nucleação para um complexo de proteínas (etapa ❸) que leva a mensagem do receptor de insulina para os alvos finais no citosol e no núcleo, por meio de uma longa série de proteínas intermediárias. Primeiro, um resíduo de Ⓟ-Tyr do IRS-1 se liga ao **domínio SH2** da proteína Grb2. (SH2 é a abreviação de *Src homology 2*, homologia a SRC 2, assim nomeado porque a sequência de um domínio SH2 é similar àquela da Src [pronuncia-se sarc], outra Tyr-cinase.) Diversas proteínas de sinalização contêm domínios SH2, todas as quais ligam resíduos de Ⓟ-Tyr em uma proteína associada. Grb2 é uma proteína adaptadora, sem atividade enzimática intrínseca. Sua função é aproximar duas proteínas (neste caso, IRS-1 e a proteína Sos) que devem interagir para que a transdução de sinal seja possível. Além do domínio SH2 (ligação de Ⓟ-Tyr), a Grb2 também contém um segundo domínio de ligação à proteína, SH3, que se liga a uma região rica em prolina da Sos, recrutando a Sos para o crescente complexo receptor. Quando ligada a Grb2, a Sos atua como fator de troca de nucleotídeos de guanosina (GEF), catalisando a substituição do GDP ligado por GTP na proteína G Ras.

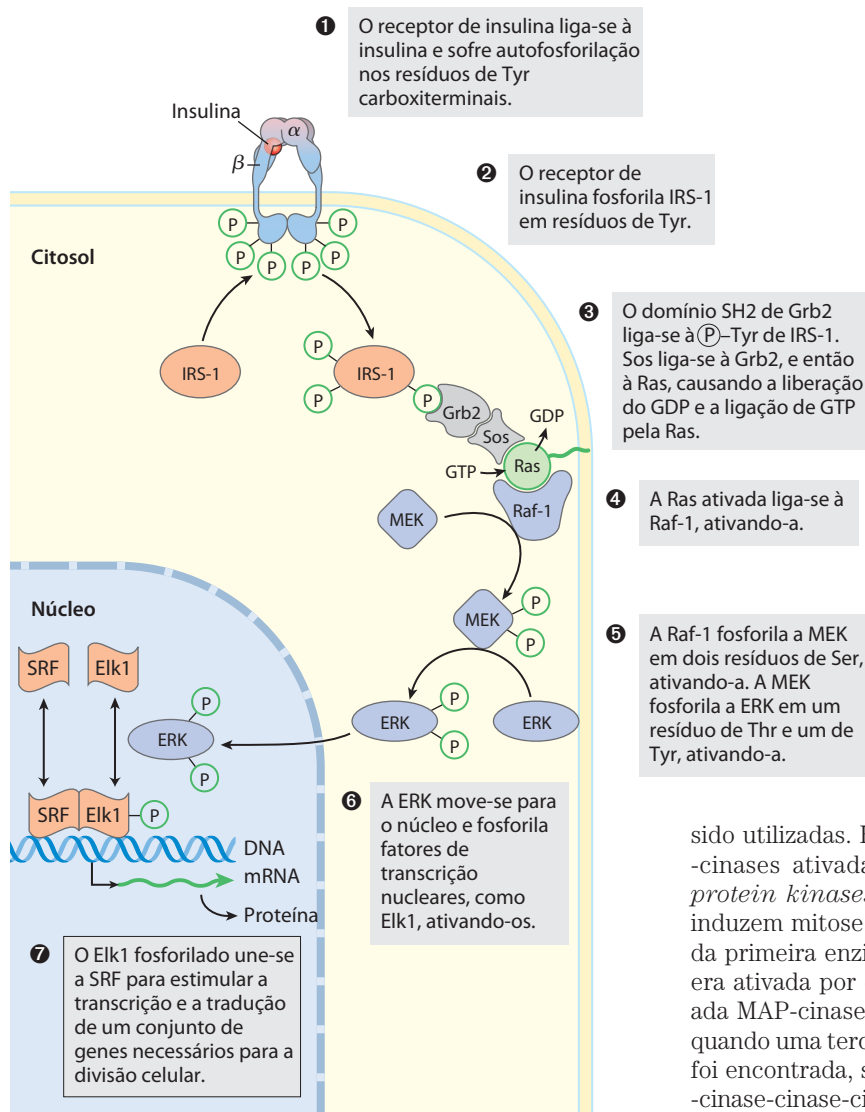



**FIGURA 12-15 Regulação da expressão gênica pela insulina por meio de uma cascata de MAP-cinases.** O receptor de insulina (INSR) consiste em duas subunidades $\alpha$ na face externa da membrana plasmática e duas subunidades $\beta$ que atravessam a membrana e projetam-se para dentro do citosol. A ligação da insulina à subunidade $\alpha$ provoca uma mudança conformacional que permite a autofosforilação dos resíduos de Tyr no domínio carboxiterminal das subunidades $\beta$. A autofosforilação também ativa o domínio Tyr--cinase, que então catalisa a fosforilação de outras proteínas-alvo. A rota de sinalização por meio da qual a insulina regula a expressão de genes específicos envolve uma cascata de proteínas-cinases, em que cada uma delas ativa a próxima. O INSR é uma proteína-cinase específica para Tyr; as outras cinases (todas mostradas em azul) fosforilam resíduos de Ser ou Thr. MEK é uma cinase com dupla especificidade, que fosforila tanto um resíduo de Thr quanto um resíduo de Ser na cinase com regulação extracelular (ERK, de *extracellular regulated kinase*); MEK é a cinase ativada por mitógeno ativadora de ERK (de *mitogen-activated ERK-activated kinase*) e SRF é o fator de resposta ao soro (de *serum response factor*).

A **Ras** é o protótipo de uma família de **proteínas G pequenas** que controlam uma ampla variedade de transduções de sinal (ver Quadro 12-2). Como a proteína G trimérica que opera com o sistema $\beta$-adrenérgico (Figura 12-5), a Ras pode existir em uma conformação ligada a GTP (ativa) ou ligada a GDP (inativa), porém a Ras (~20 kDa) atua como monômero. Quando ligada ao GTP, a Ras pode ativar uma proteína-cinase, Raf-1 (Figura 12-15, etapa ❹), a primeira de três proteínas-cinases – Raf-1, MEK e ERK – que formam uma cascata na qual cada cinase ativa a próxima por fosforilação (etapa ❺). As proteínas-cinases MEK e ERK são ativadas pela fosforilação de um resíduo de Thr e um resíduo de Tyr. Quando ativada, a ERK controla alguns dos efeitos biológicos da insulina, entrando no núcleo e fosforilando fatores de transcrição como o Elk1 (etapa ❻), que modula a transcrição de aproximadamente 100 genes regulados pela insulina (etapa ❼), alguns dos quais codificam proteínas essenciais para a divisão celular. Dessa maneira, a insulina atua como fator de crescimento.

As proteínas Raf-1, MEK e ERK são membros de três famílias maiores, para as quais diversas nomenclaturas têm sido utilizadas. ERK está na família das **MAPK** (proteínas--cinases ativadas por mitógenos, de *mitogen-activated protein kinases*; mitógenos são sinais extracelulares que induzem mitose e divisão celular). Logo após a descoberta da primeira enzima MAPK, foi descoberto que esta enzima era ativada por outra proteína-cinase, que foi então nomeada MAP-cinase-cinase (a MEK pertence a esta família), e quando uma terceira cinase que ativava a MAP-cinase-cinase foi encontrada, sua família recebeu o jocoso nome de MAP--cinase-cinase-cinase (a Raf-1 está nessa família). Um pouco menos complicadas são as abreviações para as três famílias: MAPK, MAPKK, MAPKKK. As cinases nas famílias MAPK e MAPKKK são específicas para resíduos de Ser ou Thr, e as MAPKK (nesse caso, a MEK) fosforilam um resíduo de Ser e um de Tyr de seu substrato, uma MAPK (nesse caso, a ERK).

Atualmente, bioquímicos estão conscientes de que a rota da insulina é somente um exemplo de uma estratégia mais abrangente na qual os sinais hormonais, por rotas similares àquela mostrada na Figura 12-15, resultam na fosforilação de enzimas-alvo por proteínas-cinases. O alvo da fosforilação com frequência é outra proteína-cinase, que, então, fosforila uma terceira proteína-cinase e assim por diante. O resultado é uma cascata de reações que amplifica o sinal inicial em muitas ordens de magnitude (ver Figura 12-1b). As **cascatas das MAPK** (Figura 12-15) controlam a sinalização iniciada por diversos fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, de *platelet-derived growth factor*) e o fator de crescimento da epiderme (EGF, de *epidermal growth factor*). Outra estratégia geral exemplificada pela rota do receptor de insulina é a utilização de proteínas adaptadoras não enzimáticas para a união dos componentes de uma via de sinalização ramificada, as quais serão apresentadas agora.

## O fosfolipídeo de membrana $PIP_3$ age em uma ramificação da sinalização pela insulina

A rota de sinalização da insulina ramifica-se em IRS-1 (Figura 12-15, etapa ❷). Grb2 não é a única proteína que se associa com o IRS-1. A enzima fosfoinositídeo-3-cinase (PI3K) liga-se a IRS-1 por meio do domínio SH2 da PI3K (**Figura 12-16**). Uma vez ativada, a PI3K converte o lipídeo de membrana fosfatidilinositol-4,5-bifosfato ($PIP_2$) a fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato ($PIP_3$). A cabeça polar do $PIP_3$ multiplamente carregada, que se projeta da face citoplasmática da membrana plasmática, é o ponto inicial para uma segunda ramificação da sinalização, envolvendo outra cascata de proteínas-cinases. Quando ligada a $PIP_3$, a proteína-cinase B (PKB, também chamada de Akt) é fosforilada e ativada por outra proteína-cinase, a PDK1. A PKB ativada, então, fosforila resíduos de Ser ou Thr em suas proteínas-alvo, uma das quais sendo a glicogênio-sintase-cinase (GSK3). Na forma ativa, não fosforilada, a GSK3 fosforila a glicogênio-sintase, inativando-a e, deste modo, contribuindo para a redução na síntese de glicogênio. (Esse mecanismo é apenas parte da explicação para os efeitos da insulina sobre o metabolismo do glicogênio.) Quando fosforilada pela PKB, a GSK3 é inativada. Assim, impedindo a inativação da glicogênio-sintase no fígado e no músculo, a cascata de fosforilações de proteínas iniciada pela insulina estimula a síntese de glicogênio (Figura 12-16). Em uma terceira ramificação da sinalização nos tecidos muscular e adiposo, a PKB inicia o movimento mediado por clatrina dos transportadores de glicose (GLUT4) de vesículas internas para a membrana plasmática, estimulando a captação da glicose da corrente sanguínea (Figura 12-16, etapa ❺; ver também o Quadro 11-1).

Como em todas as rotas de sinalização, existe um mecanismo para o término da atividade da rota da PI3K-PKB. Uma fosfatase específica para $PIP_3$ (PTEN em humanos) remove o grupo fosfato da posição 3 do $PIP_3$ e gera $PIP_2$, que não serve como sítio de ligação para a PKB, e a cadeia de sinalização é rompida. Em diversos tipos de câncer, o gene para a PTEN com frequência encontra-se mutado, resultando em um circuito de regulação defeituoso e níveis anormalmente elevados de $PIP_3$ e de atividade da PKB. O resultado parece ser um sinal contínuo para a divisão celular e, consequentemente, para o crescimento tumoral. ■

O receptor de insulina é o protótipo de diversos receptores enzimáticos com estrutura similar e atividade de RTK (**Figura 12-17**). Os receptores para EGF e PDGF, por exemplo, apresentam semelhanças em estrutura e sequência com o INSR, e ambos têm uma atividade Tyr-cinásica que fosforila IRS-1. Muitos desses receptores dimerizam após a interação com o ligante; o INSR é uma exceção, pois já é um dímero $(\alpha\beta)_2$ antes da ligação da insulina. (O protô-

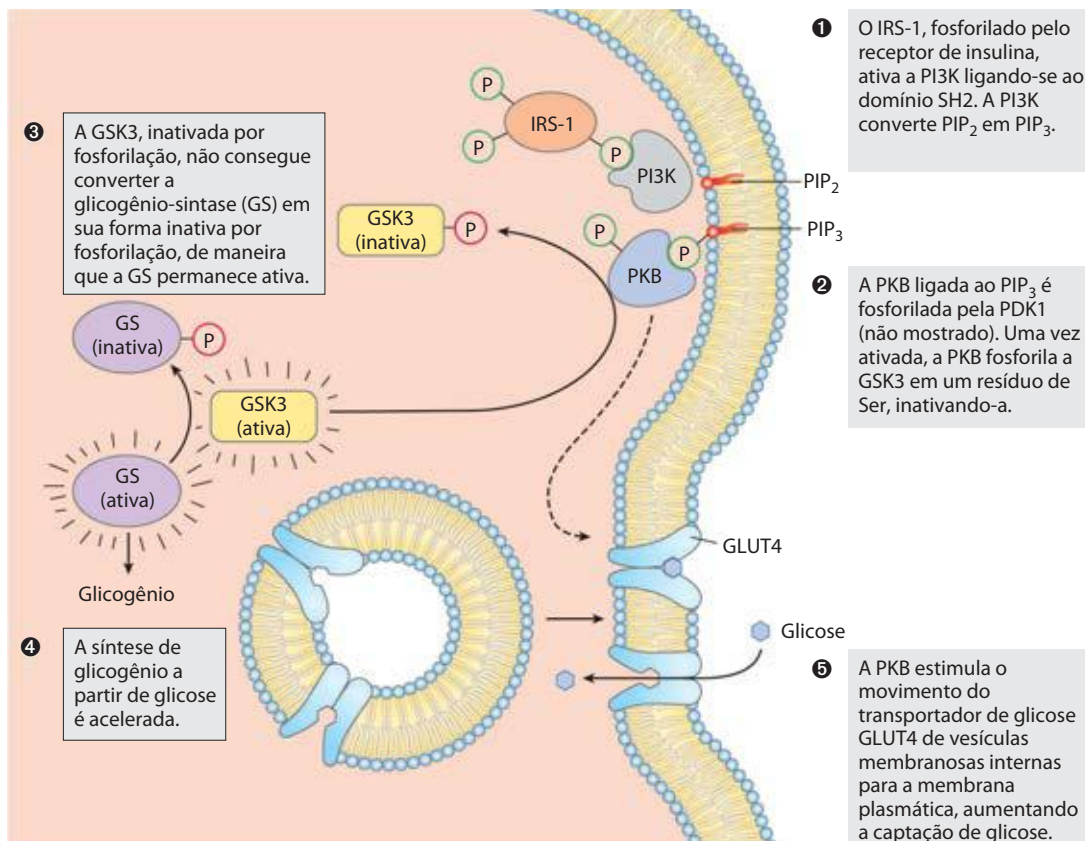



**FIGURA 12-16 Ação da insulina na síntese de glicogênio e no movimento de GLUT4 para a membrana plasmática.** A ativação da PI3-cinase (PI3K) pelo IRS-1 fosforilado sinaliza (por meio da proteína-cinase B, PKB) o movimento do transportador de glicose GLUT4 para a membrana plasmática, e a ativação da glicogênio-sintase.

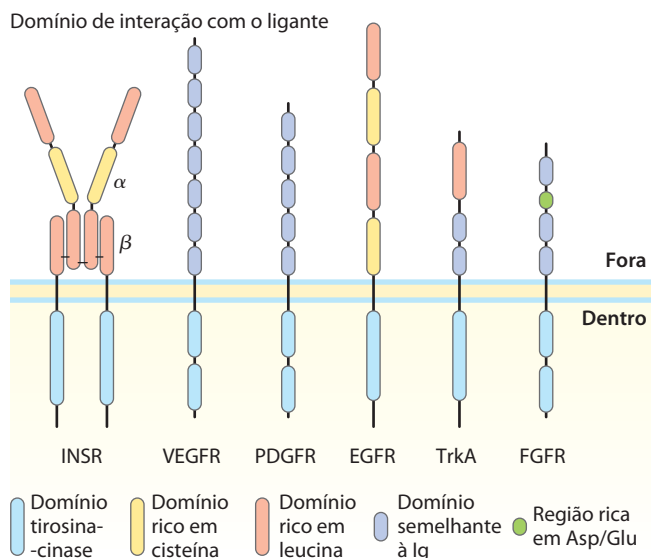



**FIGURA 12-17 Receptores tirosina-cinases.** Os receptores de fatores de crescimento que sinalizam por meio da atividade Tyr-cinásica incluem os receptores de insulina (INSR), o fator de crescimento vascular endotelial (VEGFR), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR), do fator de crescimento da epiderme (EGFR), do fator de crescimento neural de alta afinidade (TrkA) e do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR). Todos estes receptores têm um domínio Tyr-cinase na face citoplasmática da membrana plasmática (em azul). O domínio extracelular é exclusivo para cada tipo de receptor, refletindo as especificidades dos diferentes fatores de crescimento. Estes domínios extracelulares são tipicamente combinações de motivos estruturais, como os segmentos ricos em cisteína ou ricos em leucina e os segmentos contendo um dos diversos motivos comuns às imunoglobulinas (domínios semelhantes à Ig; ver Figura 4-22). Muitos outros receptores deste tipo estão codificados no genoma humano, cada qual com domínio extracelular e especificidade para o ligante diferentes.

mero do receptor de insulina é uma unidade $\alpha\beta$.) A ligação de proteínas adaptadoras, como Grb2, a resíduos de Ⓟ-Tyr é um mecanismo comum para a promoção das interações proteína-proteína iniciadas pelos RTK, tópico que será novamente abordado na Seção 12.5.

Além dos muitos receptores que atuam como proteínas--cinases específicas para Tyr (os RTK), algumas proteínas de membrana semelhantes a receptores têm atividade de Tyr-fosfatase. Com base nas estruturas dessas proteínas, é possível deduzir que seus ligantes são componentes da matriz extracelular ou moléculas da superfície de outras células. Ainda que suas funções em sinalização não sejam tão bem compreendidas quanto as funções dos RTK, essas moléculas claramente têm o potencial para reverter as ações dos sinais que estimulam os RTK.

O que impeliu a evolução de uma maquinaria de regulação tão complicada? Esse sistema permite que um receptor ativado ative diversas moléculas de IRS-1, amplificando o sinal da insulina, e possibilita a integração de sinais provenientes de diferentes receptores, como EGFR e PDGFR, cada um dos quais podendo fosforilar IRS-1. Além disso, como IRS-1 pode ativar qualquer uma das várias proteínas que contêm domínios SH2, um único receptor que atue por meio de IRS-1 pode iniciar duas ou mais rotas de sinalização; a insulina afeta a expressão gênica por meio da rota Grb2-Sos-Ras-MAPK e afeta o metabolismo do glicogênio e o transporte de glicose por meio da rota PI3K-PKB. Por fim, existem diferentes proteínas IRS estreitamente relacionadas (IRS2, IRS3), cada uma com distribuição tecidual e função características, enriquecendo ainda mais as possibilidades de sinalização em rotas iniciadas por RTK.

## O sistema de sinalização via JAK-STAT também envolve atividade tirosina-cinásica

Uma variação do sistema fundamental dos receptores Tyr--cinases são os receptores que não têm atividade cinásica intrínseca, mas que, quando ocupados pelo ligante, se ligam a uma Tyr-cinase *citosólica*. Um exemplo é o sistema que regula a formação de eritrócitos em mamíferos. O sinal para o desenvolvimento, ou **citocina**, nesse sistema é a eritropoietina (EPO), uma proteína com 165 aminoácidos produzida nos rins. Quando a EPO se liga ao seu receptor na membrana plasmática (**Figura 12-18**), o receptor di-

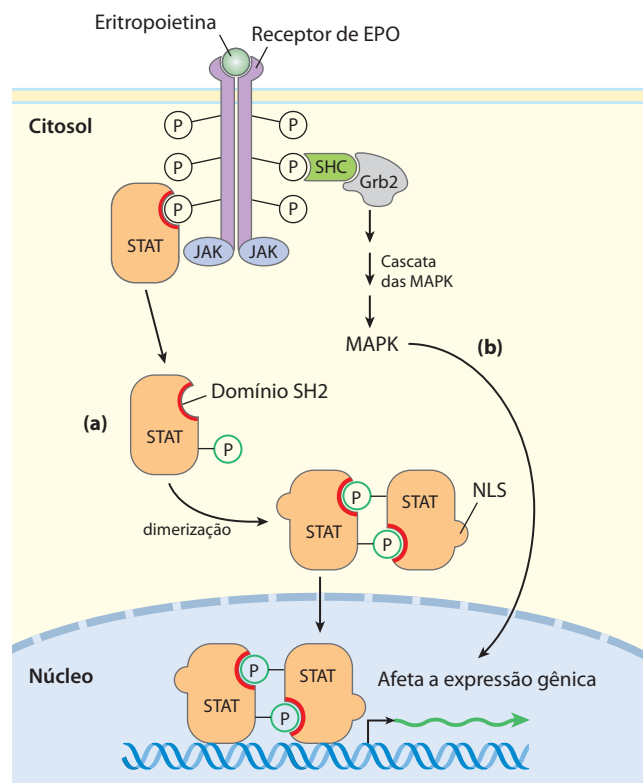



**FIGURA 12-18 O mecanismo de transdução via JAK-STAT do receptor de eritropoietina.** A ligação da eritropoietina (EPO) leva à dimerização do receptor de EPO, permitindo que a JAK, uma Tyr-cinase solúvel, ligue-se ao domínio interno do receptor e fosforile-o em diversos resíduos de Tyr. **(a)** Em uma rota de sinalização, o domínio SH2 da proteína STAT5 se liga a resíduos de Ⓟ-Tyr do receptor, aproximando-o da JAK. Em seguida à fosforilação do STAT5 pela JAK, duas moléculas de STAT5 dimerizam, cada uma ligando-se ao resíduo Ⓟ-Tyr da outra, deste modo expondo uma sequência de localização nuclear (NLS, de *nuclear localization sequence*) que direciona o dímero para transporte ao núcleo. No núcleo, o STAT5 estimula a expressão de genes controlados por EPO. **(b)** Em uma segunda rota de sinalização, após a ligação de EPO e autofosforilação de JAK, a proteína adaptadora SHC liga-se a Ⓟ-Tyr do receptor, e Grb2, então, liga-se a SHC e ativa a cascata das MAPK, como no sistema da insulina (ver Figura 12-15).

meriza, e o dímero pode se ligar e ativar a proteína-cinase solúvel JAK (de *Janus kinase*). A JAK ativada fosforila diversos resíduos de Tyr no domínio citoplasmático do receptor de EPO. Uma família de fatores de transcrição, coletivamente chamados de STAT (de *signal transducers and activators of transcription*, transdutores de sinal e ativadores da transcrição), é também alvo da JAK. Um domínio SH2 no STAT5 se liga a resíduos de Ⓟ-Tyr no receptor de EPO, posicionando o STAT para fosforilação pela JAK em resposta a EPO. O STAT5 fosforilado forma dímeros, expondo um sinal que faz com que seja transportado para dentro do núcleo. No núcleo, o STAT5 induz a expressão (transcrição) de genes específicos essenciais para a maturação dos eritrócitos. Esse sistema JAK-STAT também é utilizado por outras rotas de sinalização, incluindo a do hormônio leptina, descrita em detalhes no Capítulo 23 (ver Figura 23-36). A JAK ativada também pode estimular, por meio de Grb2, a cascata das MAPK (Figura 12-18b), que leva a alterações na expressão de genes específicos.

A Src é outra proteína Tyr-cinase solúvel que se associa com determinados receptores quando eles estão interagindo com seus ligantes. O domínio característico de ligação a Ⓟ-Tyr foi primeiramente descrito na proteína Src, sendo depois chamado de domínio de homologia a Src (SH2).

## As interconexões entre sistemas de sinalização são comuns e complexas

Embora, por simplicidade, tenham sido analisadas rotas de sinalização distintas como sequências separadas de eventos que levam a consequências metabólicas separadas, existe, na verdade, uma extensa interconexão entre os sistemas de sinalização. O circuito de regulação que governa o metabolismo é ricamente entrelaçado e estratificado. A análise das rotas de sinalização da insulina e da adrenalina foi realizada separadamente, porém elas não trabalham independentemente. A insulina contrapõe os efeitos metabólicos da adrenalina na maioria dos tecidos, e a ativação da rota de sinalização da insulina atenua diretamente o sistema de sinalização do receptor $\beta$-adrenérgico. Por exemplo, a cinase do INSR fosforila diretamente dois resíduos de Tyr na porção citoplasmática do receptor $\beta_2$-adrenérgico, e a PKB, ativada pela insulina (**Figura 12-19**), fosforila dois resíduos de Ser da mesma região. A fosforilação desses quatro resíduos desencadeia a internalização mediada por clatrina do receptor $\beta_2$-adrenérgico, retirando-o da membrana plasmática e diminuindo a sensibilidade da célula à adrenalina. Um segundo tipo de interconexão entre esses receptores ocorre quando os resíduos de Ⓟ-Tyr do receptor $\beta_2$-adrenérgico, fosforilados pelo INSR, servem como pontos de nucleação para proteínas contendo domínios SH2, como a Grb2 (Figura 12-19, lado esquerdo). A ativação da MAPK ERK pela insulina (ver Figura 12-15) é de 5 a 10 vezes maior na presença do receptor $\beta_2$-adrenérgico, presumivelmente devido a essa interconexão. Os sistemas de sinalização que utilizam cAMP e $Ca^{2+}$ também apresentam uma extensa interação; cada um desses segundos mensageiros afeta a geração e a concentração do outro. Um dos maiores desafios da biologia de sistemas é elucidar os efeitos dessas interações nas respostas metabólicas gerais de cada tecido – uma tarefa assustadora.

## RESUMO 12.3 Receptores tirosina-cinases

- O receptor de insulina, INSR, é o protótipo dos receptores enzimáticos com atividade Tyr-cinásica. Quando a insulina se liga, cada unidade $\alpha\beta$ do INSR fosforila a subunidade $\beta$ da unidade associada, ativando a função Tyr-cinásica do receptor. A cinase catalisa a fosforilação de resíduos de Tyr em outras proteínas, como IRS-1.
- Os resíduos de fosfotirosina em IRS-1 servem como sítios de ligação para proteínas contendo domínios SH2. Algumas dessas proteínas, como a Grb2, têm dois ou mais domínios de ligação a proteínas e podem atuar como adaptadores que aproximam outras proteínas.
- A Sos ligada à Grb2 catalisa a troca GDP-GTP na Ras (uma proteína G pequena), a qual, por sua vez, ativa

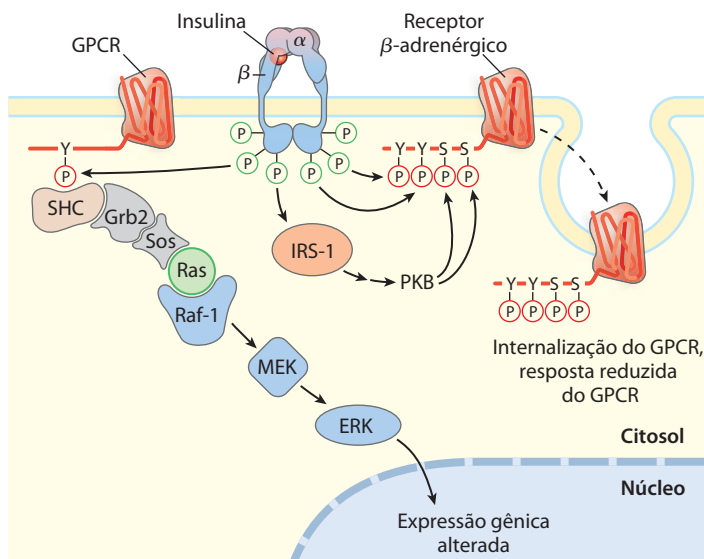



**FIGURA 12-19 Interconexão entre o receptor de insulina e o receptor $\beta_2$-adrenérgico (ou outro GPCR).** Quando o INSR é ativado pela ligação da insulina, sua Tyr-cinase fosforila diretamente o receptor $\beta_2$-adrenérgico (à direita) em dois resíduos de Tyr ($Tyr^{350}$ e $Tyr^{364}$) próximos ao carboxiterminal, e indiretamente (por meio da ativação da proteína-cinase B [PKB]; ver Figura 12-16) causa a fosforilação de dois resíduos de Ser na mesma região. O efeito destas fosforilações é a internalização do receptor adrenérgico, reduzindo a resposta ao estímulo adrenérgico. Alternativamente (à esquerda), a fosforilação catalisada pelo INSR de um GPCR (um receptor adrenérgico ou outro receptor) em uma Tyr carboxiterminal cria o ponto de nucleação para a ativação da cascata das MAPK (ver Figura 12-15), com a Grb2 atuando como proteína adaptadora. Neste caso, o INSR utiliza o GPCR para intensificar seu próprio sinal.

uma cascata de MAPK que termina com a fosforilação de proteínas-alvo no citosol e no núcleo. O resultado são mudanças metabólicas específicas e alterações na expressão gênica.

- A enzima PI3K, ativada pela interação com IRS-1, converte o lipídeo de membrana $PIP_2$ em $PIP_3$, tornando-o um ponto de nucleação para proteínas e ramificando a rota de sinalização da insulina.
- No sistema de sinalização via JAK-STAT, uma proteína Tyr-cinase solúvel (JAK) é ativada pela associação com um receptor, e então fosforila o fator de transcrição STAT, que entra no núcleo e altera a expressão de um conjunto de genes.
- Existem extensas interconexões entre as rotas de sinalização, possibilitando a integração e a regulagem exata de múltiplos efeitos hormonais.

## 12.4 Receptores guanilil-ciclases, cGMP e proteínas-cinases G

As guanilil-ciclases (**Figura 12-20**) são enzimas receptoras que, quando ativadas, convertem GTP no segundo mensageiro **monofosfato cíclico de 3',5'-guanosina** (**GMP cíclico, cGMP**):

GTP

$PP_i$

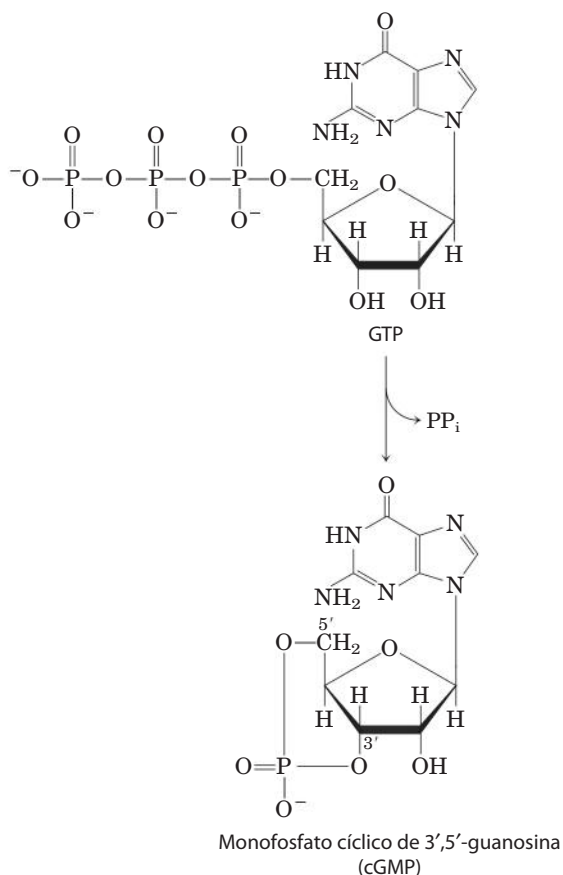
Monofosfato cíclico de 3′,5′-guanosina (cGMP)

Muitas das ações do cGMP em animais são mediadas pela **proteína-cinase dependente de cGMP**, também chamada de **proteína-cinase G** (**PKG**). Quando ativada por cGMP, a PKG fosforila resíduos de Ser e Thr em proteínas-alvo.Os domínios de regulação e catalítico dessa enzima estão contidos em um único polipeptídeo ($M_r$ ~80.000). Parte do domínio de regulação se encaixa firmemente na fenda de ligação ao substrato. A ligação de cGMP força a saída desse pseudossubstrato do sítio de ligação, abrindo o sítio para proteínas-alvo contendo a sequência consenso da PKG.

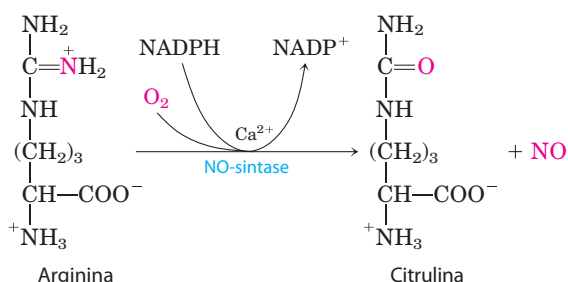
**FIGURA 12-20 Dois tipos de guanilil-ciclase que participam da transdução de sinal. (a)** Um tipo é um homodímero com um único segmento transmembrana em cada monômero, o qual conecta o domínio extracelular de interação com o ligante e o domínio intracelular guanilil-ciclase. Os receptores deste tipo sao utilizados para detectar dois ligantes extracelulares: o fator natriurético atrial (ANF; com receptores em células dos ductos coletores renais e do músculo liso vascular) e a guanilina (hormônio peptídico produzido no intestino, com receptores em células do epitélio intestinal). O receptor de guanilina também é alvo de uma toxina bacteriana que causa diarreia severa. **(b)** O outro tipo é uma enzima solúvel que contém heme e é ativada por óxido nítrico (NO) intracelular; esta forma está presente em muitos tecidos, incluindo o músculo liso do coração e dos vasos sanguíneos.

O GMP cíclico transmite diferentes mensagens em diferentes tecidos. Nos rins e no intestino, leva a alterações no transporte de íons e retenção de água; no músculo cardíaco (tipo de músculo liso), ele sinaliza relaxamento; no cérebro, ele pode estar envolvido no desenvolvimento e na função cerebral em adultos. A guanilil-ciclase renal é ativada pelo hormônio peptídico **fator natriurético atrial** (**ANF**, de *atrial natriuretic factor*), liberado pelas células do átrio cardíaco quando o coração está estirado pelo aumento do volume sanguíneo. Transportado até os rins pelo sangue, o ANF ativa a guanilil-ciclase nas células dos ductos coletores (Figura 12-20a). O aumento resultante na [cGMP] desencadeia um aumento na excreção renal de $Na^+$ e, consequentemente, de água, impelida pela variação na pressão osmótica. A perda de água reduz o volume de sangue, opondo-se ao estímulo que inicialmente causou a secreção de ANF. O músculo liso vascular também possui um receptor guanilil-ciclase para o ANF; quando ligado a esse receptor, o ANF causa o relaxamento (vasodilatação) dos vasos sanguíneos, o que aumenta o fluxo de sangue enquanto diminui a pressão sanguínea.

Um receptor guanilil-ciclase similar presente na membrana plasmática das células epiteliais que revestem o intestino é ativado pelo peptídeo **guanilina** (Figura 12-20a), que regula a secreção de $Cl^-$ no intestino. Esse receptor também é o alvo de uma endotoxina proteica termoestável produzida por *Escherichia coli* e outras bactérias gram-negativas. O aumento na [cGMP] causado pela endotoxina eleva a secreção de $Cl^-$ e, consequentemente, diminui a reabsorção de água pelo epitélio intestinal, causando diarreia.

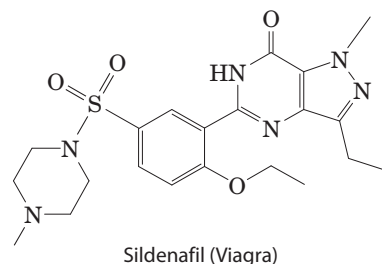
Um tipo diferente de guanilil-ciclase é uma proteína citosólica fortemente associada a um grupo heme (Figura 12-20b), enzima ativada por óxido nítrico (NO, de *nitric oxide*). O óxido nítrico é produzido a partir de arginina pela enzima **NO-sintase** dependente de $Ca^{2+}$, presente em muitos tecidos de mamíferos, difundindo-se da célula de origem para as células próximas.

$O_2$, NADPH → $NADP^+$; $Ca^{2+}$; NO-sintase; + NO

Arginina — Citrulina

O NO é suficientemente apolar para atravessar as membranas plasmáticas sem um transportador. Na célula-alvo, ele se liga ao grupo heme da guanilil-ciclase e ativa a produção de cGMP. No coração, uma proteína-cinase dependente de cGMP reduz o vigor das contrações por meio do estímulo de bombas de íons que removem o $Ca^{2+}$ do citosol.

O relaxamento do músculo cardíaco induzido por NO é uma resposta do mesmo tipo daquela provocada pela nitroglicerina e outros nitrovasodilatadores receitados para o alívio de **angina pectoris**, a dor causada pela contração de um coração privado de $O_2$ devido ao bloqueio das artérias coronárias. O óxido nítrico é instável e sua ação é breve; dentro de segundos após a formação, ele é oxidado a nitrito ou nitrato. Os nitrovasodilatadores produzem um relaxamento prolongado do músculo cardíaco porque são metabolizados ao longo de algumas horas, gerando uma liberação constante de NO. O valor da nitroglicerina para o tratamento de angina foi descoberto acidentalmente nas fábricas que produziam nitroglicerina para uso como explosivo na década de 1860. Os trabalhadores com angina relataram que os sintomas eram muito reduzidos durante a semana de trabalho, e que aumentavam durante os finais de semana. Os médicos tratando desses pacientes ouviram essa história com tanta frequência que fizeram a conexão, e assim foi descoberto um medicamento.

Os efeitos da síntese de cGMP elevada diminuem quando o estímulo cessa, pois uma fosfodiesterase específica (cGMP-PDE) converte o cGMP ao inativo 5'-GMP. Os humanos têm diferentes isoformas da cGMP-PDE, com diferentes distribuições teciduais. A isoforma dos vasos sanguíneos do pênis é inibida pelo fármaco sildenafil (Viagra), o qual, portanto, mantém a [cGMP] elevada após ter sido aumentada por um estímulo apropriado, justificando a utilidade desse fármaco para o tratamento da disfunção erétil.

Sildenafil (Viagra) ■

O GMP cíclico tem outro modo de ação no olho dos vertebrados: ele causa a abertura de canais iônicos específicos nos cones e bastonetes da retina. A função do cGMP será abordada na discussão sobre a visão na Seção 12.10.

**RESUMO 12.4 Receptores guanilil-ciclases, cGMP e proteínas-cinases G**

- Diversos sinais, incluindo o fator natriurético atrial e a guanilina, agem por meio de receptores enzimáticos com atividade de guanilil-ciclase. O cGMP produzido dessa maneira é um segundo mensageiro que ativa a proteína-cinase dependente de cGMP (PKG). Essa enzima altera o metabolismo por meio da fosforilação de enzimas-alvo específicas.
- O óxido nítrico é um mensageiro de vida curta que estimula uma guanilil-ciclase solúvel, elevando a [cGMP] e ativando a PKG.

## 12.5 Proteínas adaptadoras multivalentes e balsas lipídicas da membrana

Duas generalizações emergiram dos estudos sobre os sistemas de sinalização como aqueles discutidos até este momento: (1) proteínas-cinases que fosforilam resíduos de Tyr, Ser e Thr são essenciais para a sinalização, *diretamente* afetando as atividades de um grande número de substratos proteicos por meio de sua fosforilação, e (2) as interações proteína-proteína que resultam da fosforilação reversível de resíduos de Tyr, Ser e Thr em proteínas sinalizadoras criam *sítios de ancoragem* para outras proteínas que causam efeitos *indiretos* em proteínas a jusante na rota de sinalização. Na verdade, muitas proteínas de sinalização são *multivalentes* – elas podem interagir com diversas proteínas diferentes simultaneamente para formar complexos de sinalização multiproteicos. Esta seção apresenta alguns exemplos que ilustram os princípios gerais das interações proteicas dependentes de fosforilação em rotas de sinalização.

### Módulos proteicos se ligam aos resíduos de Tyr, Ser ou Thr das proteínas associadas

A proteína Grb2 da rota de sinalização da insulina (Figuras 12-15 e 12-19) liga-se por meio do domínio SH2 a outras proteínas que apresentem resíduos de Tyr expostos. O ge-

noma humano codifica pelo menos 87 proteínas que contêm SH2, muitas já conhecidas por participarem da sinalização celular. O resíduo de Ⓟ-Tyr liga-se a uma fenda profunda do domínio SH2, com cada um dos oxigênios do fosfato participando de ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas; as cargas positivas de dois resíduos de Arg são muito importantes para a ligação. As diferenças sutis na estrutura dos domínios SH2 são responsáveis pela especificidade da interação das proteínas contendo SH2 com as várias proteínas que contêm Ⓟ-Tyr. O domínio SH2 tipicamente interage com uma Ⓟ-Tyr (à qual é atribuída a posição 0) e com os próximos três resíduos em direção ao carboxiterminal (designados +1, +2, +3). Alguns domínios SH2 (Src, Fyn, Hck, Nck) preferem resíduos negativamente carregados nas posições +1 e +2; outros (PLCγ1, SHP2) têm uma longa fenda hidrofóbica que se liga a resíduos alifáticos nas posições +1 a +5. Essas diferenças definem as diferentes especificidades das subclasses de domínios SH2.

Os domínios de ligação a fosfotirosina (**domínios PTB**, de *phosphotyrosine-binding domain*; **Figura 12-21**) também se associam a proteínas com Ⓟ-Tyr, porém suas sequências críticas e sua estrutura tridimensional os distinguem dos domínios SH2. O genoma humano codifica 24 proteínas que contêm domínios PTB, incluindo o IRS-1, com sua função como proteína adaptadora na transdução do sinal da insulina já comentada (Figura 12-15). Os sítios de ligação a Ⓟ-Tyr dos domínios SH2 e PTB nas proteínas às quais eles associam-se são criados por Tyr-cinases e eliminados por proteína-tirosina-fosfatases / fosfotirosina-fosfatases (PTPases).

Outras proteínas-cinases sinalizadoras, incluindo PKA, PKC, PKG e membros da cascata das MAPK, fosforilam resíduos de Ser ou Thr nas proteínas-alvo, as quais, em alguns casos, adquirem a capacidade de interagir com outras proteínas por meio do resíduo fosforilado, desencadeando um processo subsequente. Uma "sopa de letrinhas" de domínios que se ligam aos resíduos de Ⓟ-Ser ou Ⓟ-Thr tem sido identificadas, e certamente outras ainda serão encontradas. Cada domínio protege uma determinada sequência ao redor do resíduo fosforilado, de maneira que os domínios representam famílias com sítios de reconhecimento altamente específicos, capazes de ligar-se a um subconjunto específico de proteínas fosforiladas.

Em alguns casos, a região de uma proteína que se liga a Ⓟ-Tyr de um substrato proteico está encoberta pela interação com uma Ⓟ-Tyr na mesma proteína. Por exemplo, a proteína Tyr-cinase solúvel Src, quando fosforilada em um resíduo de Tyr crítico, torna-se inativa; um domínio SH2 que deveria ligar-se ao substrato proteico liga-se, ao invés, à Ⓟ-Tyr interna. Quando esse resíduo de Ⓟ-Tyr é hidrolisado por uma fosfoproteína-fosfatase, a atividade Tyr-cinásica da Src é ativada (**Figura 12-22a**). Similarmente, a glicogênio-sintase-cinase-3 (GSK3, de *glycogen synthase kinase 3*) está inativa quando fosforilada em um resíduo de Ser do

**FIGURA 12-21 Interação de um domínio PTB com um resíduo de Ⓟ-Tyr de uma proteína associada.** (Identidade no PDB 1SHC) O domínio PTB está representado como uma superfície molecular em azul. O resíduo de Ⓟ-Tyr da proteína associada (em vermelho) se projeta para dentro de um bolso de ligação no domínio PTB onde ele é firmemente mantido por meio de múltiplas interações não covalentes.

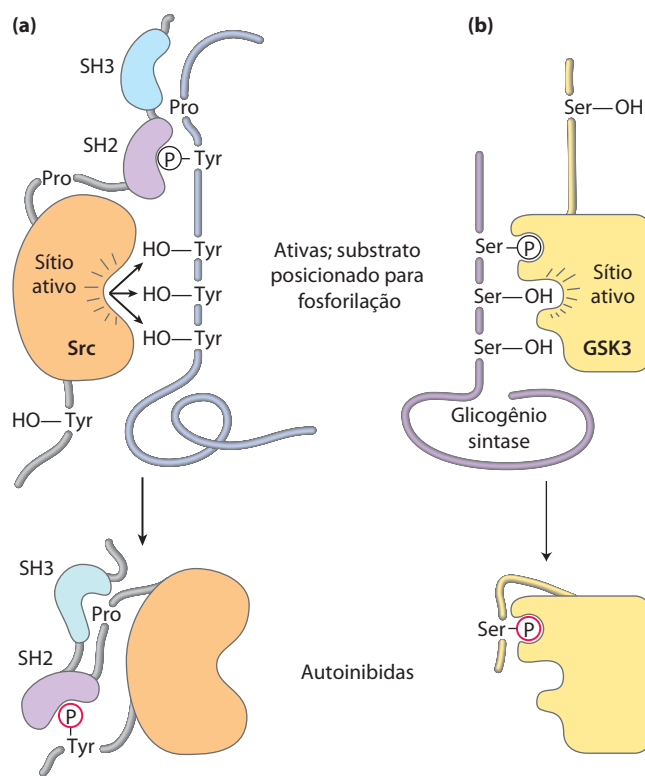



**FIGURA 12-22 O mecanismo de autoinibição de Src e GSK3. (a)** Na forma ativa da Tyr-cinase Src, um domínio SH2 liga-se a uma Ⓟ-Tyr do substrato proteico, e um domínio SH3 liga-se a uma região do substrato rica em prolina, alinhando o sítio ativo da cinase com alguns resíduos-alvo de Tyr no substrato (parte superior). Quando a Src é fosforilada em um resíduo de Tyr específico (parte inferior), o domínio SH2 liga-se a Ⓟ-Tyr interna em vez de ligar-se a Ⓟ-Tyr do substrato, e o domínio SH3 liga-se a uma região interna rica em prolina, impedindo a efetiva ligação enzima-substrato; a enzima está, portanto, autoinibida. **(b)** Na forma ativa da glicogênio-sintase-cinase-3 (GSK3), um domínio de ligação a Ⓟ-Ser interno está disponível para ligar a Ⓟ-Ser do substrato (a glicogênio-sintase) e, deste modo, posicionar a cinase para forforilar os resíduos de Ser vizinhos (parte superior). A fosforilação de um resíduo de Ser interno permite que um segmento interno da cinase ocupe o sítio de ligação a Ⓟ-Ser, bloqueando a ligação do substrato (parte inferior).

domínio autoinibitório (Figura 12-22b). A desfosforilação desse domínio libera a enzima para ligar-se (e depois fosforilar) suas proteínas-alvo.

Além dos três resíduos comumente fosforilados em proteínas, existe uma quarta estrutura a partir da qual se formam complexos supramoleculares de proteínas sinalizadoras: o grupo polar fosforilado dos fosfatidilinositóis da membrana. Muitas proteínas de sinalização contêm domínios como SH3 e PH (domínio de homologia à plextrina; de *plextrin homology*) que se ligam firmemente ao $PIP_3$ que se projeta a partir da face interna da membrana plasmática. Sempre que a enzima PI3K gerar esse grupo polar fosforilado (como acontece em resposta ao sinal da insulina), proteínas que se ligam a $PIP_3$ irão agrupar-se na superfície da membrana.

A maioria das proteínas envolvidas em sinalização na membrana plasmática tem um ou mais domínios de ligação a proteínas ou fosfolipídeos; muitas têm três ou mais, sendo, portanto, multivalentes nas interações com outras proteínas sinalizadoras. A **Figura 12-23** mostra apenas algumas das proteínas multivalentes conhecidas por participar da sinalização. Muitos dos complexos incluem componentes com domínios de ligação à membrana. Considerando que tantos processos de sinalização estabelecem-se na superfície interna da membrana plasmática, as moléculas que devem colidir para produzir a resposta sinalizadora estão efetivamente confinadas a um espaço bidimensional – a superfície da membrana; as colisões aqui são muito mais prováveis do que no espaço tridimensional do citosol.

Em resumo, um quadro extraordinário de rotas de sinalização tem emergido a partir dos estudos de muitas proteínas sinalizadoras e seus múltiplos domínios de ligação. Um sinal inicial resulta na fosforilação do receptor ou de uma proteína-alvo, iniciando o agrupamento de grandes complexos multiproteicos, unidos sobre arcabouços com capacidades de ligação multivalentes. Alguns desses complexos contêm diferentes proteínas-cinases que ativam umas às outras em sequência, produzindo uma cascata de fosforilações e uma grande amplificação do sinal inicial. As interações entre as cinases destas cascatas não são deixadas ao acaso das colisões aleatórias no espaço tridimensional. Na cascata

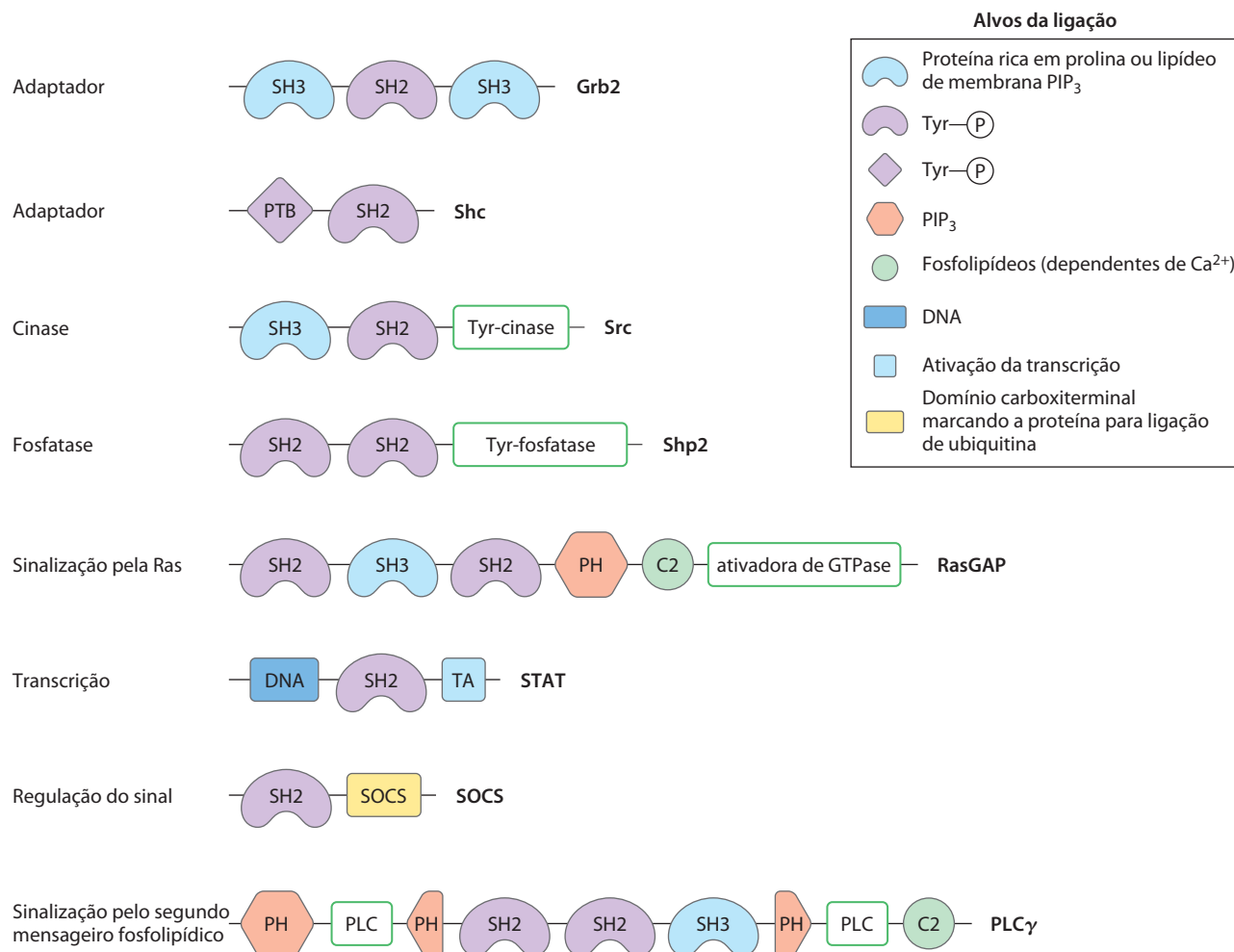



**FIGURA 12-23 Alguns módulos de ligação de proteínas sinalizadoras.** Cada proteína está representada por uma linha (com a extremidade aminoterminal à esquerda); os símbolos indicam a localização de domínios conservados (as especificidades estão listadas na legenda; abreviações estão explicadas no texto); os retângulos em verde indicam atividades catalíticas. O nome de cada proteína está mostrado na extremidade carboxiterminal. Estas proteínas sinalizadoras interagem com proteínas fosforiladas ou fosfolipídeos em diversos arranjos e combinações para formar complexos de sinalização integrados.

das MAPK, por exemplo, uma proteína de ancoragem, KSR, liga as três cinases (MAPK, MAPKK e MAPKKK), garantindo sua proximidade e a orientação correta, e até mesmo conferindo propriedades alostéricas às interações entre as cinases, o que torna essa série de fosforilações sensível a estímulos muitos pequenos (**Figura 12-24**).

As fosfotirosina-fosfatases removem o fosfato dos resíduos de Ⓟ-Tyr, revertendo o efeito da fosforilação. Algumas delas são proteínas de membrana similares a receptores, presumivelmente controladas por fatores extracelulares ainda não identificados; outras PTPases são solúveis e contêm domínios SH2. Além disso, as células animais têm proteínas Ⓟ-Ser- e Ⓟ-Thr-fosfatases, que revertem os efeitos de proteínas-cinases específicas para Ser e Thr. É possível observar, assim, que a sinalização ocorre em *circuitos proteicos*, os quais efetivamente conectam o receptor do sinal ao efetor da resposta, podendo ser desligados instantaneamente pela hidrólise de uma única ligação éster de fosfato a montante.

A multivalência das proteínas sinalizadoras possibilita a montagem de muitas combinações diferentes de módulos de sinalização, sendo cada combinação apropriada para sinais, tipos celulares e circunstâncias metabólicas específicas, gerando diversos circuitos de sinalização de extraordinária complexidade.

**FIGURA 12-24 Uma proteína de ancoragem de levedura que organiza e regula uma cascata de proteínas-cinases. (a)** A proteína de ancoragem KSR tem sítios de ligação para cada uma das três cinases da cascata da Raf/MEK/Erk. Por ligar todas elas nas orientações apropriadas, a proteína de ancoragem torna as interações entre estas proteínas rápidas e eficientes. Quando a Erk é ativada (à esquerda), ela fosforila o sítio de ligação da Raf (à direita), forçando uma mudança conformacional que desloca a Raf e, portanto, impede a fosforilação da MEK. O resultado desta regulação por retroalimentação é a fosforilação temporária da MEK. **(b)** Nas células de levedura com uma KSR mutante, carecendo dos sítios de fosforilação (curva em vermelho), a retroalimentação não ocorre, originando uma curva de tempo diferente para a sinalização.

## Balsas lipídicas da membrana e cavéolas podem segregar proteínas sinalizadoras

As balsas lipídicas (Capítulo 11) são regiões da bicamada da membrana enriquecidas em esfingolipídeos, esteróis e certas proteínas, incluindo muitas proteínas unidas à bicamada por meio de âncoras de GPI. O receptor $\beta$-adrenérgico é segregado em balsas que contêm proteínas G, adenilil-ciclase, PKA e uma proteína-fosfatase específica, PP2, que, em conjunto, fornecem uma unidade de sinalização altamente integrada. Pela segregação em uma pequena região da membrana plasmática de todos os elementos necessários para responder a um sinal e para extingui-lo, a célula é capaz de produzir uma "lufada" de segundo mensageiro extremamente curta e localizada.

Alguns RTK (EGFR e PDGFR) parecem estar localizados em balsas lipídicas, sendo muito provável que este isolamento seja funcionalmente significativo. Quando o colesterol é removido das balsas pelo tratamento da membrana com ciclodextrina (que se liga e remove o colesterol), as balsas são danificadas e as rotas de sinalização via RTK se tornam defeituosas.

Caso um RTK seja fosforilado em uma balsa, e a única PTPase localmente disponível para reverter essa fosforilação esteja em outra balsa, a desfosforilação do RTK é retardada ou impedida. As interações entre proteínas adaptadoras podem ser suficientemente fortes para recrutar para dentro de uma balsa uma proteína sinalizadora que normalmente não se localiza na balsa, ou pode mesmo ser forte o suficiente para remover um receptor de uma balsa. Por exemplo, em fibroblastos isolados, o EGFR geralmente está concentrado em balsas especializadas, chamadas cavéolas (ver Figura 11-22), porém o tratamento com EGF leva à saída do receptor da balsa. Essa migração é dependente da atividade proteína-cinásica do receptor; receptores mutantes que carecem desta atividade permanecem na balsa durante o tratamento com EGF. A caveolina, uma proteína integral da membrana localizada nas cavéolas, é fosforilada em resíduos de Tyr em resposta à insulina, e o EGFR agora ativado pode recrutar para a balsa seus parceiros de ligação. A segregação espacial de proteínas sinalizadoras em balsas adiciona outra dimensão aos já complexos processos iniciados pelos sinais extracelulares.

## RESUMO 12.5 Proteínas adaptadoras multivalentes e balsas lipídicas da membrana

- Muitas proteínas sinalizadoras apresentam domínios que se ligam aos resíduos de Tyr, Ser ou Thr fosforilados

em outras proteínas; a especificidade de ligação para cada domínio é determinada pelas sequências adjacentes ao resíduo fosforilado do substrato.

- Domínios SH2 e PTB se ligam a proteínas que contenham resíduos de Ⓟ-Tyr; outros domínios se ligam aos resíduos de Ⓟ-Ser e Ⓟ-Thr em diferentes contextos.
- Domínios SH3 e PH se ligam ao fosfolipídeo de membrana $PIP_3$.
- Muitas proteínas de sinalização são multivalentes, com diversos módulos de ligação diferentes. As células criam um grande número de complexos de sinalização multiproteicos por meio da combinação das especificidades de substratos das várias proteínas-cinases com as especificidades de domínios que se ligam a resíduos de Ser, Thr ou Tyr fosforilados, e com fosfatases que podem inativar rapidamente uma rota de sinalização.
- Balsas de membrana e cavéolas sequestram grupos de proteínas sinalizadoras em pequenas regiões da membrana plasmática, intensificando suas interações e tornando a sinalização mais eficiente.

## 12.6 Canais iônicos controlados por portões

### Canais iônicos são a base da sinalização elétrica nas células excitáveis

Certas células dos organismos multicelulares são "excitáveis": elas podem detectar um sinal externo, convertê-lo em um sinal elétrico (especificamente, uma alteração do potencial da membrana) e passá-lo adiante. As células excitáveis desempenham papéis essenciais na condução nervosa, na contração muscular, na secreção hormonal, nos processos sensoriais, no aprendizado e na memória. A excitabilidade de células sensoriais, de neurônios e de miócitos depende de canais iônicos, transdutores de sinal que fornecem uma rota regulada para o movimento de íons inorgânicos, como $Na^+$, $K^+$, $Ca^{2+}$ e $Cl^-$, através da membrana plasmática em resposta a vários estímulos. Relembre do Capítulo 11 que esses canais iônicos são controlados por "portões": podem estar abertos ou fechados, dependendo do receptor associado estar ativado pela interação com seu ligante específico (um neurotransmissor, por exemplo) ou por uma variação no potencial elétrico transmembrana, $V_m$. A $Na^+K^+$-ATPase é eletrogênica; ela cria um desequilíbrio de cargas através da membrana plasmática por transportar 3 $Na^+$ para fora da célula para cada 2 $K^+$ transportados para dentro (**Figura 12-25a**), tornando o interior negativo em relação ao exterior. A membrana, assim, é dita polarizada.

**CONVENÇÃO-CHAVE:** $V_m$ é negativo quando o interior da célula é negativo em relação ao exterior. Para uma célula animal típica, $V_m = -50$ a $-70$ mV. ■

Como os canais iônicos geralmente permitem a passagem de ânions ou de cátions, mas não de ambos, o fluxo dos íons por um canal causa uma redistribuição de cargas nos dois lados da membrana, alterando $V_m$. A entrada de um

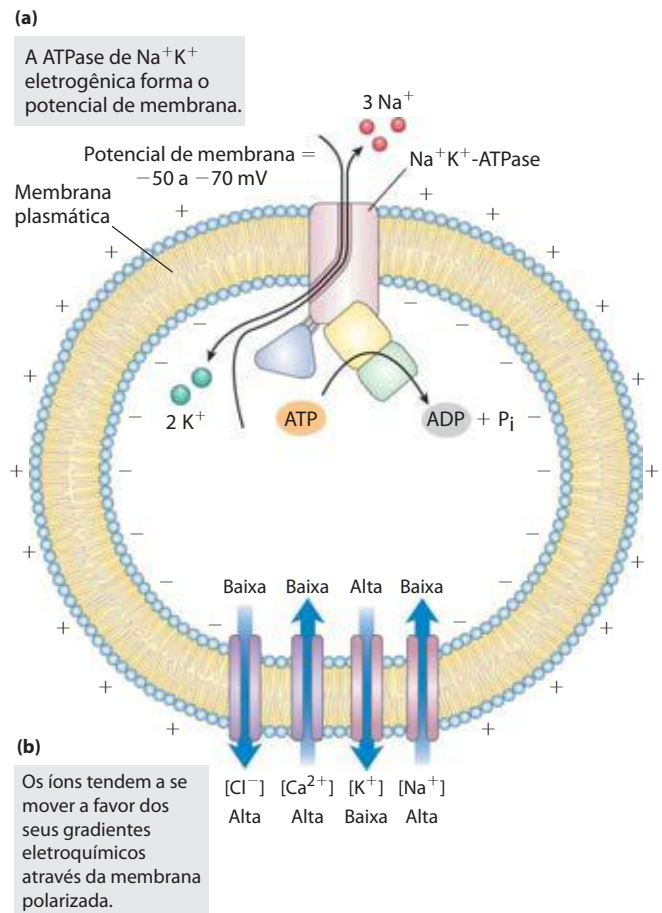



**FIGURA 12-25 Potencial elétrico transmembrana. (a)** A ATPase de $Na^+K^+$ eletrogênica produz um potencial elétrico transmembrana de aproximadamente −60 mV (interior negativo). **(b)** As setas azuis indicam a direção na qual os íons tendem a mover-se espontaneamente através da membrana plasmática de uma célula animal, impelidos por uma combinação dos gradientes químicos e elétricos. O gradiente químico impele $Na^+$ e $Ca^{2+}$ para dentro (causando despolarização) e $K^+$ para fora (causando hiperpolarização). O gradiente elétrico impele $Cl^-$ para fora, contra o seu gradiente de concentração (causando despolarização).

íon positivamente carregado, tal como o $Na^+$, ou a saída de um íon negativamente carregado, como o $Cl^-$, *despolariza* a membrana e aproxima $V_m$ de zero. Inversamente, a saída de $K^+$ *hiperpolariza* a membrana, e $V_m$ torna-se mais negativo. Esses fluxos iônicos pelos canais são passivos, ao contrário do transporte ativo efetuado pela de $Na^+K^+$-ATPase.

A direção do fluxo iônico espontâneo por uma membrana polarizada é determinada pelo potencial eletroquímico de membrana para aquele íon, o qual possui dois componentes: a diferença na concentração ($C$) do íon nos dois lados da membrana, e a diferença no potencial elétrico, expressa em milivolts. A força ($\Delta G$) que causa a passagem espontânea de um cátion (p. ex., $Na^+$) para dentro da célula por meio de um canal iônico é uma função da razão de sua concentração nos dois lados da membrana ($C_{dentro}/C_{fora}$) e da diferença no potencial elétrico ($V_m$ ou $\Delta\psi$):

$$\Delta G = RT \ln (C_{dentro}/C_{fora}) + Z\mathcal{J}V_m \qquad (12\text{-}1)$$

onde $R$ é a constante dos gases, $T$ a temperatura absoluta, $Z$ a carga do íon, e $\mathcal{F}$ a constante de Faraday. (Observe que o sinal da carga do íon determina o sinal do segundo termo da Equação 12-1.) Em um neurônio ou miócito típico, as concentrações de $Na^+$, $K^+$, $Ca^{2+}$ e $Cl^-$ no citosol são muito diferentes daquelas do fluido extracelular (Tabela 12-6). Dadas essas diferenças nas concentrações, o $V_m$ em repouso de aproximadamente −60 mV e a relação mostrada na Equação 12-1, a abertura de um canal de $Na^+$ ou $Ca^{2+}$ resultará em um fluxo espontâneo de $Na^+$ ou $Ca^{2+}$ para dentro da célula (e em despolarização), enquanto a abertura de um canal de $K^+$ resultará em um fluxo espontâneo de $K^+$ para fora da célula (e em hiperpolarização) (Figura 12-25b). O $K^+$, nesse caso, move-se contra o gradiente elétrico, devido à grande diferença de concentração dentro e fora da célula, que cria uma força química mais potente e impele o íon para fora.

Uma determinada espécie iônica continua a fluir por um canal enquanto a combinação entre gradiente de concentração e potencial elétrico provê uma força propulsora. Por exemplo, à medida que o $Na^+$ flui a favor de seu gradiente de concentração, ele despolariza a membrana. Quando o potencial de membrana atingir +70 mV, o efeito deste potencial de membrana (resistência à entrada adicional de $Na^+$) iguala o efeito do gradiente da $[Na^+]$ (que promove a entrada de $Na^+$). Nesse potencial de equilíbrio ($E$), a força propulsora ($\Delta G$) que tende a mover íons $Na^+$ é zero. O potencial de equilíbrio é diferente para cada espécie iônica, pois os gradientes de concentração são diferentes.

O número de íons que deve fluir para produzir uma variação fisiologicamente significativa no potencial de membrana é ínfimo em relação às concentrações de $Na^+$, $K^+$ e $Cl^-$ nas células e no fluido extracelular, de modo que os fluxos iônicos que ocorrem durante a sinalização em células excitáveis essencialmente não têm efeito algum sobre as concentrações desses íons. Essa situação é diferente para o $Ca^{2+}$; como a $[Ca^{2+}]$ intracelular geralmente é muito baixa (~$10^{-7}$ M), a entrada de $Ca^{2+}$ pode alterar de modo significativo a $[Ca^{2+}]$ citosólica.

O potencial de membrana de uma célula em um dado tempo é o resultado dos tipos e números de canais iônicos abertos naquele momento. Na maioria das células em repouso, mais canais de $K^+$ do que canais de $Na^+$, $Cl^-$ ou $Ca^{2+}$ estão abertos e, portanto, o potencial de repouso é mais próximo do $E$ para o $K^+$ (−98 mV) do que daquele para qualquer outro íon. Quando os canais de $Na^+$, $Ca^{2+}$ ou $Cl^-$ se abrem, o potencial de membrana move-se na direção do $E$ para o íon em questão. O tempo preciso de abertura e fechamento de canais iônicos e as variações transitórias resultantes no potencial de membrana são a base da sinalização elétrica por meio da qual o sistema nervoso estimula o músculo esquelético a contrair, o coração a bater ou as glândulas secretoras a liberarem seus conteúdos. Além disso, muitos hormônios exercem seus efeitos pela alteração do potencial de membrana das células-alvo. Esses mecanismos não estão limitados às células animais; canais iônicos desempenham funções importantes nas respostas de bactérias, protistas e plantas aos sinais do ambiente.

Para ilustrar a ação dos canais iônicos na sinalização célula-célula, serão descritos os mecanismos pelos quais um neurônio passa adiante um sinal ao longo de todo o seu comprimento e atravessa uma sinapse até o próximo neurônio (ou até um miócito) em um circuito celular, utilizando a acetilcolina como neurotransmissor.

## Os canais iônicos controlados por voltagem produzem os potenciais de ação neuronais

A sinalização no sistema nervoso é efetuada por redes de neurônios, células especializadas que transferem um impulso elétrico (potencial de ação) a partir de uma extremidade da célula (o corpo celular) ao longo de uma extensão citoplasmática alongada (o axônio). O sinal elétrico desencadeia a liberação de moléculas de neurotransmissores na sinapse, transferindo o sinal para a próxima célula no circuito. Três tipos de **canais iônicos controlados por voltagem** são essenciais a esse mecanismo de sinalização. Ao longo de todo o comprimento do axônio estão **canais de $Na^+$ controlados por voltagem** (**Figura 12-26**), que permanecem fechados quando a membrana está em repouso ($V_m$ = −60 mV), mas se abrem brevemente quando a membrana é despolarizada localmente em resposta à acetilcolina (ou algum outro neurotransmissor). Também distribuídos ao longo do axônio estão **canais de $K^+$ controlados por voltagem**, os quais se abrem, uma fração de segundo mais tarde, em resposta à despolarização quando os canais de $Na^+$ próximos se abrem. O fluxo despolarizante de $Na^+$ para dentro do axônio (influxo) é, portanto, rapidamente contrabalançado por um fluxo repolarizante de $K^+$ para fora do axônio (efluxo). Na extremidade distal do axônio estão **canais de $Ca^{2+}$ controlados por voltagem**, que se abrem quando chega a onda de despolarização (etapa ❶) e repolarização (etapa ❷), causada pelas atividades dos canais de $Na^+$ e $K^+$, desencadeando a liberação do neurotransmissor acetilcolina – que transmite o sinal para outro neurônio (dispare um potencial de ação!) ou para uma fibra muscular (contraia!).

**TABELA 12-6** Concentrações de íons em células e fluidos extracelulares (mM)

| Tipo celular | $K^+$ Dentro | $K^+$ Fora | $Na^+$ Dentro | $Na^+$ Fora | $Ca^{2+}$ Dentro | $Ca^{2+}$ Fora | $Cl^+$ Dentro | $Cl^+$ Fora |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Axônio de lula | 400 | 20 | 50 | 440 | ≤ 0,4 | 10 | 40-150 | 560 |
| Músculo de sapo | 124 | 2,3 | 10,4 | 109 | < 0,1 | 2,1 | 1,5 | 78 |

**FIGURA 12-26 Função dos canais iônicos controlados por voltagem e controlados por ligante na transmissão neural.** Inicialmente, a membrana plasmática do neurônio pré-sináptico está polarizada (interior negativo) pela ação da $Na^+K^+$-ATPase eletrogênica, que bombeia 3 $Na^+$ para fora da célula para cada 2 $K^+$ bombeados para dentro (ver Figura 12-25). ❶ A estimulação deste neurônio (não mostrada) causa o avanço de um potencial de ação ao longo do axônio (setas azuis), que se distancia do corpo celular. A abertura de um canal de $Na^+$ controlado por voltagem permite a entrada de $Na^+$, e a despolarização local resultante causa a abertura dos canais de $Na^+$ adjacentes, e assim por diante. A direcionalidade do movimento do potencial de ação é garantida pelo breve período refratário subsequente à abertura de cada canal de $Na^+$ controlado por voltagem. ❷ Uma fração de segundo após a passagem do potencial de ação por um ponto do axônio, canais de $K^+$ controlados por voltagem se abrem, permitindo a saída de $K^+$, o que causa a despolarização da membrana (setas vermelhas), preparando-a para o próximo potencial de ação. (Para maior clareza, os canais de $Na^+$ e os canais de $K^+$ estão ilustrados em lados opostos do axônio; ambos os tipos de canais estão distribuídos de maneira uniforme na membrana do axônio.) ❸ Quando a onda de despolarização atinge a extremidade do axônio, canais de $Ca^{2+}$ controlados por voltagem se abrem, permitindo a entrada de $Ca^{2+}$. ❹ O resultante aumento na $[Ca^{2+}]$ interna desencadeia a liberação, por exocitose, do neurotransmissor acetilcolina para dentro da fenda sináptica. ❺ A acetilcolina liga-se a um receptor no neurônio (ou miócito) pós-sináptico, levando à abertura de seu canal iônico controlado por ligante. ❻ $Na^+$ e $Ca^{2+}$ extracelular entram por meio deste canal, despolarizando a célula pós-sináptica. O sinal elétrico, deste modo, foi transferido para o corpo celular do neurônio (ou miócito) pós-sináptico e irá deslocar-se ao longo do axônio até um terceiro neurônio (ou miócito) por meio desta mesma sequência de eventos.

Os canais de $Na^+$ controlados por voltagem são altamente seletivos para o $Na^+$ em comparação a outros cátions (por um fator de 100 vezes ou mais) e apresentam uma velocidade de fluxo muito alta (> $10^7$ íons/s). Depois de aberto – ativado – por uma redução no potencial elétrico transmembrana, um canal de $Na^+$ passa por uma inativação extremamente rápida – dentro de milissegundos, o canal fecha e permanece inativo por muitos milissegundos. Como os canais de $K^+$ controlados por voltagem se abrem em resposta à despolarização induzida pela abertura dos canais de $Na^+$ (etapa ❶ na Figura 12-26), a entrada de $K^+$ repolariza localmente a membrana (restabelece o potencial de membrana com o interior negativo; etapa ❷). Um curto pulso de despolarização, portanto, viaja pelo axônio conforme a despolarização localizada desencadeia a breve abertura dos canais de $Na^+$, e posteriormente dos canais de $K^+$, vizinhos. O curto período refratário que se segue à abertura de cada canal de $Na^+$, durante o qual ele não pode abrir-se novamente, assegura que uma onda de despolarização unidirecional – o potencial de ação – percorra a célula nervosa, a partir do corpo celular e em direção à ponta do axônio.

Quando a onda de despolarização atinge os canais de $Ca^{2+}$ controlados por voltagem, eles se abrem (etapa ❸), e o $Ca^{2+}$ entra a partir do espaço extracelular. O aumento na $[Ca^{2+}]$ citoplasmática, então, provoca a liberação de acetilcolina para dentro da fenda sináptica por exocitose (etapa ❹). A acetilcolina se difunde até a célula pós-sináptica (outro neurônio ou um miócito), onde se liga aos seus receptores e inicia a despolarização. Dessa maneira, a mensagem é transmitida à próxima célula do circuito. Observa-se, portanto, que os canais iônicos controlados transmitem os sinais elétricos de duas maneiras: pela variação da concentração citoplasmática de um íon (como o $Ca^{2+}$), que então atua como segundo mensageiro intracelular, ou pela variação do $V_m$, que altera outras proteínas da membrana sensíveis ao $V_m$. A passagem de um sinal elétrico por um neurônio, e deste para outro neurônio, ilustra ambos os tipos de mecanismo.

A estrutura e o mecanismo dos canais de $K^+$ controlados por voltagem foram discutidos com algum detalhe na Seção 11.3 (ver Figuras 11-47 e 11-48). Aqui serão abordados os canais de $Na^+$. O componente essencial de um canal de $Na^+$ é um único e grande polipeptídeo (1.840 resíduos de aminoácidos), organizado em quatro domínios agrupados ao redor de um canal central (**Figura 12-27a, b**), que origina uma passagem para o $Na^+$ através da membrana. A especificidade desta passagem para o $Na^+$ é efetuada por uma "região do poro" composta pelos segmentos entre as hélices transmembrana 5 e 6 de cada domínio, que se do-

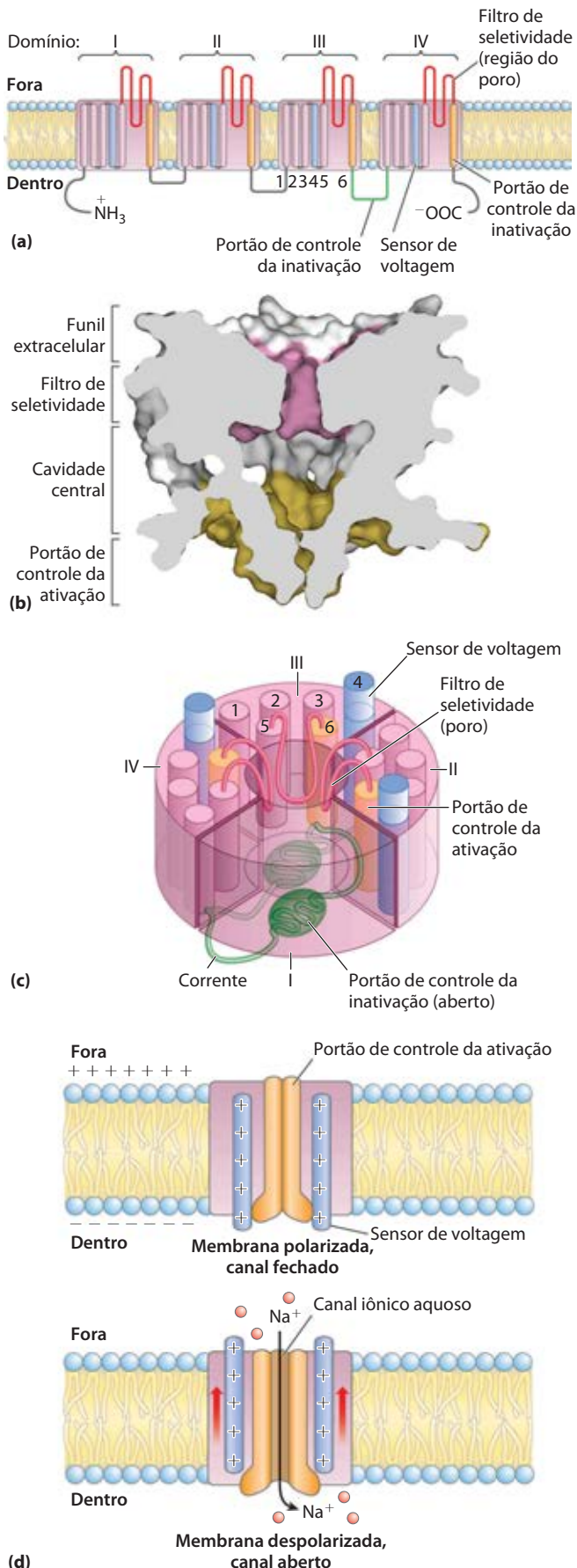



**FIGURA 12-27 Canais de $Na^+$ controlados por voltagem em neurônios.** Os canais de sódio de diferentes tecidos e organismos têm uma grande variedade de subunidades, porém apenas a subunidade principal ($\alpha$) é essencial. **(a)** A subunidade $\alpha$ é uma proteína grande com quatro domínios homólogos (I a IV, mostrados separados para ilustrar as diferentes partes), cada um contendo seis hélices transmembrana (1 a 6). A hélice 4 de cada domínio (em azul) é o sensor de voltagem; supõe-se que a hélice 6 (em cor de laranja) seja o portão que controla a ativação. Os segmentos entre as hélices 5 e 6, a região do poro (em vermelho), formam o filtro de seletividade, e o segmento conectando os domínios III e IV (em verde) é o portão que controla a inativação. **(b)** (PDB ID 3RW0) Estrutura de um canal de $Na^+$ controlado por voltagem (da bactéria *Arcobacter butzleri*, mas provavelmente similar aos canais dos neurônios de vertebrados), com abertura em forma de funil no lado extracelular, filtro de seletividade de íons, cavidade central aquosa e o domínio de ativação no lado citoplasmático. **(c)** Uma visão esquemática do canal de $Na^+$. Os quatro domínios são enrolados ao redor de um canal transmembrana central revestido com resíduos de aminoácidos polares. As quatro regiões do poro (em vermelho) aproximam-se da superfície extracelular para formar o filtro de seletividade, que é conservado em todos os canais de $Na^+$. O filtro garante ao canal a capacidade de discriminar entre o $Na^+$ e outros íons de tamanho similar. O portão controlador da inativação (em verde) se fecha (linhas pontilhadas) logo após a abertura do portão controlador da ativação. **(d)** O mecanismo sensor da voltagem envolve o movimento perpendicular em relação ao plano da membrana da hélice 4 em resposta a uma variação no potencial transmembrana. Como mostrado no painel superior, a forte carga positiva da hélice 4 possibilita que ela seja atraída para dentro da célula em resposta ao potencial de membrana ($V_m$) quando o interior é negativo. A despolarização reduz esta atração, e a hélice 4 relaxa, movendo-se em direção ao exterior (painel inferior). Este movimento é comunicado ao portão que controla a ativação (em cor de laranja), induzindo alterações conformacionais que abrem o canal.

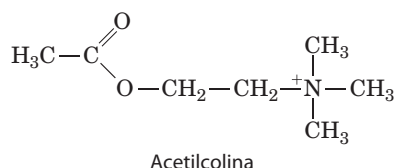
bram para dentro do canal. A hélice 4 de cada domínio tem uma alta densidade de resíduos de Arg positivamente carregados; acredita-se que esse segmento mova-se para dentro da membrana em resposta a variações na voltagem transmembrana, do potencial de repouso de cerca de −60 mV para aproximadamente +30 mV. O movimento da hélice 4 inicia a abertura do canal, e essa é a base do controle por voltagem (Figura 12-27c).

Imagina-se que a inativação do canal (durante o período refratário) ocorra por um mecanismo de "bola e corrente" (o termo se refere à bola de ferro que era antigamente acorrentada à perna dos prisioneiros). Um domínio proteico na superfície citoplasmática do canal de $Na^+$, o portão que controla a inativação (a "bola"), é preso ao canal por um curto segmento do polipeptídeo (a "corrente"; Figura 12-27b). Esse domínio está livre para se movimentar quando o canal está fechado, porém, quando ele se abre, um sítio na face interna do canal torna-se disponível para a ligação da "bola acorrentada", bloqueando o canal. O comprimento da corrente parece determinar por quanto tempo um canal iônico permanece aberto: quanto maior a corrente, maior o período aberto. Outros canais iônicos podem ser inativados por um mecanismo similar.

## O receptor de acetilcolina é um canal iônico controlado por ligante

O **receptor nicotínico de acetilcolina** controla a passagem do sinal de um neurônio eletricamente excitado em alguns tipos de sinapses e em junções neuromusculares (entre um neurônio motor e uma fibra muscular), desen-

cadeando a contração muscular. (Os receptores nicotínicos de acetilcolina foram originalmente distinguidos dos receptores muscarínicos de acetilcolina pela sensibilidade dos primeiros à nicotina, e dos muscarínicos ao alcaloide muscarina presente em cogumelos. São estrutural e funcionalmente diferentes.) A acetilcolina liberada pelo neurônio pré-sináptico ou pelo neurônio motor se difunde por alguns micrômetros até a membrana plasmática do neurônio pós-sináptico ou do miócito, onde se liga ao receptor de acetilcolina. Isso força uma mudança conformacional no receptor, causando a abertura de seu canal iônico. O movimento resultante de cátions para dentro da célula despolariza a membrana plasmática. Em uma fibra muscular, isso inicia a contração. O receptor de acetilcolina permite a pronta passagem de íons $Na^+$, $Ca^{2+}$ e $K^+$, porém outros cátions e todos os ânions são incapazes de passar. O movimento de $Na^+$ pelo canal iônico do receptor de acetilcolina é insaturável (a velocidade é linear em relação à $[Na^+]$ extracelular) e muito rápido – cerca de $2 \times 10^7$ íons/s sob condições fisiológicas.

$$H_3C-C(=O)-O-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3$$

Acetilcolina

Como outros canais iônicos controlados por portões, o receptor de acetilcolina se abre em resposta à estimulação pela molécula sinalizadora e possui um mecanismo de cronometragem intrínseco que fecha o portão milissegundos após sua abertura. Assim, o sinal da acetilcolina é transitório – comprovadamente uma propriedade essencial para a condução dos sinais elétricos. As alterações estruturais que formam a base do controle dos receptores de acetilcolina são compreendidas, mas não o mecanismo exato de "dessensibilização", por meio do qual o canal permanece fechado mesmo na presença contínua de acetilcolina.

O receptor nicotínico de acetilcolina tem cinco subunidades ($\alpha_2\beta\gamma\delta$), cada uma das quais com quatro segmentos helicoidais transmembrana (M1 a M4) (**Figura 12-28**). As cinco subunidades, com sequências e estruturas terciárias similares, circundam um poro central, que é revestido pelas hélices M2. O poro apresenta cerca de 20 Å de largura nas porções do canal que se projetam das superfícies citoplasmáticas e extracelulares, porém estreita-se conforme atravessa a bicamada lipídica. Próximo ao centro da bicamada está um anel de cadeias laterais volumosas e hidrofóbicas de resíduos de Leu das hélices M2, posicionadas tão próximas umas das outras que impedem a passagem de íons pelo canal (Figura 12-28d). A ligação da acetilcolina aos sítios em cada subunidade $\alpha$ força todas as hélices M2 a girarem levemente, movendo os volumosos resíduos de Leu para o lado e substituindo-os por resíduos menores e polares. O alargamento do poro permite a passagem de íons ($Na^+$ e $Ca^{2+}$).

## Neurônios têm canais receptores que respondem a diferentes neurotransmissores

As células animais, especialmente aquelas do sistema nervoso, contêm uma grande variedade de canais iônicos controlados por ligante, voltagem ou ambos. Os receptores que são eles mesmos canais iônicos são classificados como **ionotrópicos**, para distingui-los dos receptores que geram um segundo mensageiro (receptores metabotrópicos). Até agora, o foco tem sido a acetilcolina como neurotransmissor, mas existem muitos outros. 5-hidroxitriptamina (serotonina), glutamato e glicina podem agir por meio de canais receptores estruturalmente relacionados ao receptor de acetilcolina. A serotonina e o glutamato desencadeiam a abertura de canais de cátions ($K^+$, $Na^+$, $Ca^{2+}$), enquanto a glicina abre canais específicos para $Cl^-$. Canais de cátions e ânions distinguem-se por diferenças sutis nos resíduos de aminoácidos que revestem o canal hidrofílico. Os canais de cátions têm cadeias laterais negativamente carregadas de Glu e Asp em posições críticas. Quando alguns desses resíduos ácidos são experimentalmente substituídos por resíduos básicos, o canal de cátions é convertido em um canal de ânions.

Dependendo do íon que passa pelo canal, a interação com o ligante (neurotransmissor) daquele canal resulta na despolarização ou na hiperpolarização da célula-alvo. Um único neurônio normalmente recebe sinais de muitos outros neurônios, cada qual liberando seu próprio neurotransmissor característico, com o efeito despolarizante ou hiperpolarizante característico. O $V_m$ da célula-alvo, portanto, reflete o sinal *integrado* (Figura 12-1e) de múltiplos neurônios. A célula responde com um potencial de ação apenas se esse sinal integrado somar-se até uma despolarização suficientemente grande.

Os canais receptores de acetilcolina, glicina, glutamato e ácido γ-aminobutírico (GABA) são controlados por ligantes *extracelulares*. Segundos mensageiros *intracelulares* – como cAMP, cGMP, $IP_3$, $Ca^{2+}$ e ATP – regulam canais iônicos de outra classe, que, como será visto na Seção 12.10, participam das transduções sensoriais da visão, do olfato e do paladar.

## As toxinas são direcionadas a canais iônicos

Muitas das toxinas mais potentes da natureza atuam sobre canais iônicos. Por exemplo, a dendrotoxina (da serpente mamba negra) bloqueia a ação dos canais de $K^+$ controlados por voltagem, a tetrodotoxina (produzida pelo baiacu) age sobre canais de $Na^+$ controlados por voltagem, e a cobrotoxina desativa os canais iônicos receptores de acetilcolina. Por que, no curso da evolução, os canais iônicos se tornaram o alvo preferencial de toxinas, em vez de algum alvo metabólico essencial, como enzima crucial para o metabolismo energético?

Os canais iônicos são amplificadores excepcionais; a abertura de um único canal pode permitir o fluxo de 10 milhões de íons por segundo. Em consequência, relativamente poucas moléculas de uma proteína de canal iônico são necessárias por neurônio para as funções de sinaliza-

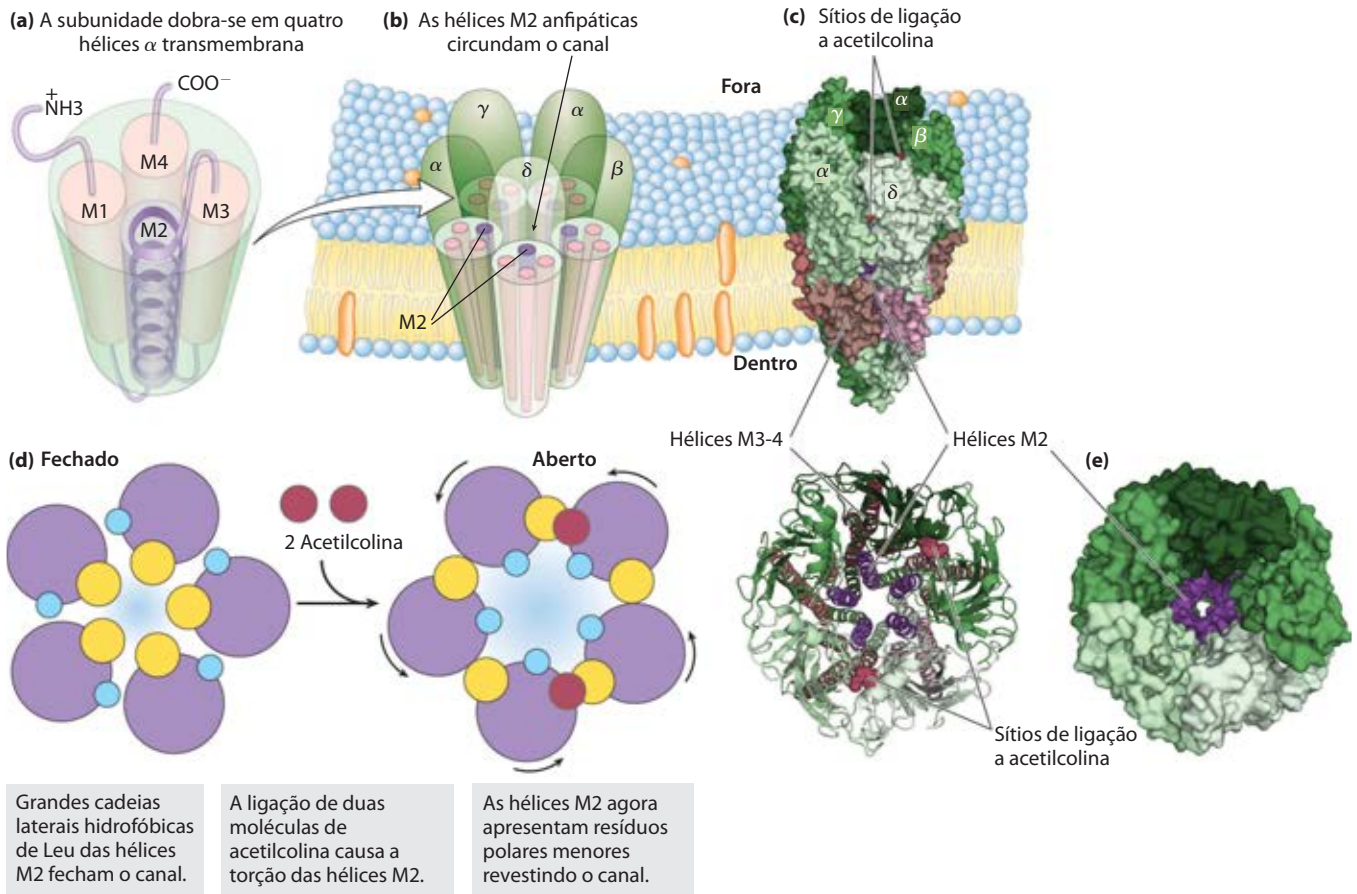



**FIGURA 12-28 O canal iônico receptor de acetilcolina.** **(a)** Cada uma das cinco subunidades homólogas ($\alpha_2\beta\gamma\delta$) tem quatro hélices transmembrana, M1 a M4. As hélices M2 são anfipáticas; as outras contêm principalmente resíduos hidrofóbicos. **(b)** As cinco subunidades são arranjadas ao redor de um canal transmembrana central, que é revestido pelos resíduos polares das hélices M2. Na extremidade superior e na inferior do canal estão anéis de resíduos de aminoácidos negativamente carregados. **(c)** Modelo molecular do receptor de acetilcolina, com base na estrutura determinada por raios X de uma proteína relacionada (a proteína de ligação à acetilcolina de um molusco; PDB ID 1UV6). **(d)** Esta ilustração de um corte transversal pelo centro das hélices M2 mostra cinco cadeias laterais de Leu (em amarelo), uma de cada hélice M2, projetando-se para dentro do canal e constringindo-o a um diâmetro pequeno demais para permitir a passagem de $Ca^{2+}$, $Na^+$ ou $K^+$. Quando ambos os sítios de ligação a acetilcolina (um em cada subunidade α) estão ocupados, ocorre uma mudança conformacional. À medida que as hélices M2 se torcem levemente, os cinco resíduos de Leu são afastados do canal e são substituídos por resíduos polares menores (em azul). Este mecanismo de controle abre o canal, permitindo a passagem de $Ca^{2+}$, $Na^+$ ou $K^+$. **(e)** Modelo molecular do receptor de acetilcolina visto perpendicularmente à membrana, mostrando o pequeno poro central que permite a passagem de íons.

ção. Isso significa que um número relativamente pequeno de moléculas de toxina com alta afinidade por canais iônicos, agindo do exterior celular, pode ter um efeito muito pronunciado sobre a neurossinalização do corpo inteiro. Um efeito comparável via uma enzima metabólica, tipicamente presente nas células em concentrações muito maiores do que os canais iônicos, exigiria muito mais cópias da molécula de toxina.

## RESUMO 12.6 Canais iônicos controlados por portões

- Canais iônicos controlados pelo potencial de membrana ou por ligantes são cruciais para a sinalização em neurônios e outras células.
- Os canais de $Na^+$ e $K^+$ controlados por voltagem das membranas neuronais conduzem o potencial de ação ao longo do axônio na forma de uma onda de despolarização (entrada de $Na^+$) seguida pela repolarização (saída de $K^+$).
- O mecanismo de controle dos canais sensíveis a voltagem envolve o movimento, perpendicular ao plano da membrana, de um peptídeo transmembrana com alta densidade de cargas, devido à presença de Arg ou outros resíduos carregados.
- A chegada de um potencial de ação à extremidade distal de um neurônio pré-sináptico desencadeia a liberação de neurotransmissor. O neurotransmissor (acetilcolina, por exemplo) difunde-se até o neurônio pós-sináptico (ou miócito, na junção neuromuscular), liga-se a receptores específicos na membrana plasmática, e provoca uma variação no $V_m$.

- O receptor de acetilcolina de neurônios e miócitos é um canal iônico controlado por ligante; a ligação da acetilcolina provoca uma mudança conformacional que abre o canal a íons $Na^+$ e $Ca^{2+}$.
- As neurotoxinas produzidas por muitos organismos atacam canais iônicos, e, assim, têm ação rápida e letal.

## 12.7 Integrinas: receptores bidirecionais da adesão celular

As **integrinas** são proteínas da membrana plasmática que controlam a adesão das células umas às outras e à matriz extracelular, e transmitem sinais em ambas as direções através da membrana (**Figura 12-29**). O genoma de mamíferos codifica 18 subunidades $\alpha$ diferentes e 8 subunidades $\beta$ diferentes, encontradas em uma ampla gama de combinações com variadas especificidades para ligantes em vários tecidos. Cada uma das 24 integrinas diferentes encontradas até agora parece desempenhar uma função distinta. Como as integrinas podem informar às células sobre a vizinhança extracelular, elas desempenham funções cruciais em processos que requerem interações celulares seletivas, como o desenvolvimento embrionário, a coagulação sanguínea, o funcionamento das células imunológicas, a diferenciação celular normal e o crescimento e a metástase tumorais.

Os ligantes extracelulares que interagem com as integrinas incluem colágeno, fibrinogênio, fibronectina e muitas outras proteínas que têm a sequência reconhecida pelas integrinas: -Arg-Gly-Asp- (RGD, utilizando as abreviações de uma única letra dos aminoácidos). As curtas extensões citoplasmáticas das subunidades $\alpha$ e $\beta$ interagem com as proteínas do citoesqueleto logo abaixo da membrana plasmática – talina, $\alpha$-actinina, vinculina, paxilina e outras – modulando a montagem das estruturas do citoesqueleto com base em actina. A dupla associação das integrinas com a matriz extracelular e o citoesqueleto permite que a célula integre as informações sobre o ambiente extracelular e intracelular, além de coordenar o posicionamento do citoesqueleto com os sítios de adesão extracelulares. Com essa propriedade, as integrinas governam a forma, a mobilidade, a polaridade e a diferenciação de muitos tipos celulares. Na sinalização "de fora para dentro", os domínios extracelulares de uma integrina passam por mudanças conformacionais globais dramáticas quando o ligante interage com um sítio localizado muitos ângstroms distante das hélices transmembrana. Essas mudanças, de alguma maneira, alteram a disposição das caudas citoplasmáticas das subunidades $\alpha$ e $\beta$, alterando suas interações com proteínas intracelulares e, assim, conduzindo o sinal para dentro da célula.

A conformação e a adesividade dos domínios extracelulares das integrinas também são drasticamente afetadas pela sinalização "de dentro para fora" iniciada por sinais *de dentro* da célula. Em uma conformação, os domínios extracelulares não apresentam afinidade pelas proteínas da matriz extracelular, mas sinais celulares podem favorecer

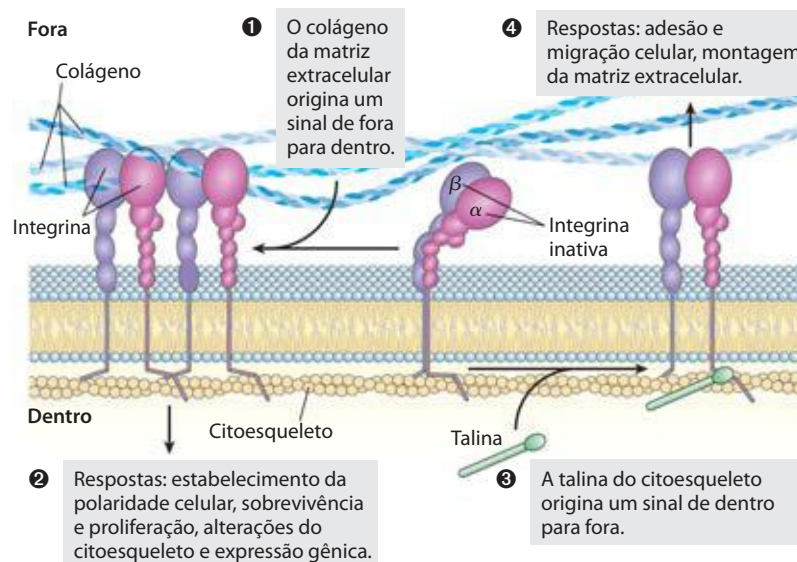



**FIGURA 12-29 A sinalização em duas vias pelas integrinas.** Todas as integrinas têm uma subunidade $\alpha$ e uma subunidade $\beta$, cada uma com uma curta extensão citoplasmática, uma única hélice transmembrana e um grande domínio extracelular com o sítio de interação com o ligante. A subunidade $\beta$ (em roxo) é rica em resíduos de Cys e apresenta muitas ligações dissulfeto intracadeia. Em muitas integrinas, a subunidade $\alpha$ (em cor-de-rosa) tem alguns sítios de ligação a cátions divalentes, como $Ca^{2+}$, essenciais para a atividade de interação com o ligante. No estado inativo, o domínio extracelular está dobrado sobre si mesmo (no centro). O contato com um ligante extracelular (colágeno ou heparan-sulfato, por exemplo) endireita o domínio extracelular e afasta as caudas citosólicas das subunidades $\alpha$ e $\beta$ (à esquerda), alterando suas interações com proteínas intracelulares, como a talina, que, por sua vez, conectam as integrinas aos filamentos de actina do citoesqueleto. Na sinalização de dentro para fora, o contato do domínio citosólico com a talina produz um desdobramento dramático do domínio extracelular (à direita) e um aumento em sua afinidade pelos parceiros de ligação extracelulares, permitindo interações com proteínas extracelulares ou proteoglicanos, e alterando a adesão da célula à matriz extracelular. Os ligantes proteicos da matriz extracelular têm a sequência RGD, reconhecida pelas integrinas.

outra conformação, na qual as integrinas aderem firmemente às proteínas extracelulares (Figura 12-29).

A regulação da adesividade é crucial para a migração dos leucócitos ao sítio de uma infecção (ver Figura 7-32), para as interações entre células do sistema imune e para a fagocitose por macrófagos. Durante uma resposta imune, por exemplo, as integrinas dos leucócitos são ativadas (expondo os sítios extracelulares de interação com o ligante) a partir do interior da célula por uma rota de sinalização iniciada por citocinas (sinais extracelulares de desenvolvimento). Uma vez ativadas, as integrinas podem mediar a ligação dos leucócitos a outras células do sistema imune ou podem marcar células para a fagocitose. A mutação no gene da integrina que codifica a subunidade $\beta$, conhecida como CD18, é a causa da deficiência de adesão leucocitária, rara doença genética humana na qual os leucócitos não conseguem atravessar os vasos sanguíneos para chegar aos sítios de infecção. Bebês com defeitos graves em CD18 geralmente morrem por infecções antes dos dois anos.

Uma integrina específica de plaquetas ($\alpha_{IIb}\beta_3$) está envolvida tanto na coagulação sanguínea normal quanto na patológica. O dano aos vasos sanguíneos no local de um ferimento expõe sítios de ligação de alta afinidade (sequências RGD na trombina e colágeno, por exemplo) às integrinas das plaquetas, que aderem à lesão, a outras plaquetas e à proteína da coagulação fibrinogênio, levando à formação do coágulo que impede o sangramento adicional. As mutações nas subunidades $\alpha$ ou $\beta$ da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ das plaquetas causam uma doença plaquetária conhecida como trombastenia de Glanzmann, na qual os indivíduos sangram excessivamente após um ferimento relativamente pequeno. O excesso de coagulação sanguínea também é indesejável. A agregação plaquetária desregulada pode levar à formação patológica de coágulos sanguíneos, resultando no bloqueio das artérias que suprem sangue ao coração e ao cérebro, e aumentando o risco de ataque cardíaco e derrame. Fármacos como tirofiban e eptifibatide, que bloqueiam os sítios externos de interação com o ligante da integrina das plaquetas, reduzem a formação de coágulos e são úteis no tratamento e na prevenção de ataques cardíacos e derrames.

Quando os tumores entram em metástase, as células tumorais perdem a adesão ao tecido original e invadem novos locais. As alterações na adesão da célula tumoral e o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese) para suprir o tumor em novo local são modulados por integrinas específicas. Essas proteínas são, portanto, potenciais alvos para fármacos que suprimam a migração e o remanejamento das células tumorais. ■

### RESUMO 12.7 Integrinas: receptores bidirecionais de adesão celular

- As integrinas compõem uma família de receptores diméricos ($\alpha\beta$) da membrana plasmática que interagem com macromoléculas extracelulares e com o citoesqueleto, transmitindo sinais para dentro e para fora da célula.
- A forma ativa e a inativa de uma integrina diferem na conformação dos domínios extracelulares. Eventos e sinais intracelulares podem interconverter as formas ativas e inativas.
- As integrinas controlam diferentes aspectos da resposta imune, coagulação sanguínea e angiogênese, e participam da metástase tumoral.

## 12.8 Regulação da transcrição por receptores nucleares de hormônios

Os hormônios esteroides, o ácido retinoico (retinoide) e os hormônios da tireoide formam um grande grupo de hormônios (ligantes de receptores) que exercem pelo menos parte de seus efeitos por meio de um mecanismo fundamentalmente diferente daquele de outros hormônios: eles atuam no núcleo e alteram a expressão gênica. Esse modo de ação será detalhado no Capítulo 28, juntamente com outros mecanismos para a regulação da expressão gênica. Aqui apresenta-se uma concisa visão geral.

Os hormônios esteroides (estrogênio, progesterona e cortisol, por exemplo), excessivamente hidrofóbicos para se dissolverem no sangue, são transportados do ponto de liberação até os tecidos-alvo por proteínas transportadoras específicas. Nas células-alvo, esses hormônios atravessam a membrana plasmática por simples difusão e se ligam a receptores proteicos específicos no núcleo (**Figura 12-30**). Os receptores dos hormônios esteroides sem o ligante (aporreceptores) frequentemente agem como supressores da transcrição dos genes-alvo. A ligação do hormônio induz alterações na conformação do receptor proteico, de modo que ele torna-se capaz de interagir com sequências reguladoras específicas no DNA, chamadas de **elementos de resposta a hormônio** (**HRE**, de *hormone response elements*) e, assim, alterar a expressão gênica (ver Figura 28-33). O complexo receptor-hormônio acoplado intensifica a expressão de genes específicos adjacentes aos HRE, com o auxílio de diversas outras proteínas essenciais à transcrição. Horas ou dias são necessários para que esses reguladores exerçam completamente seus efeitos – o tempo necessário para que as alterações na síntese de RNA e na posterior síntese de proteínas tornem-se evidentes no metabolismo alterado.

A especificidade da interação esteroide-receptor é explorada pelo uso do fármaco **tamoxifeno** para o tratamento de câncer de mama. Em alguns tipos de câncer de mama, a divisão das células cancerosas depende da presença contínua de estrogênio. O tamoxifeno é um antagonista do estrogênio; ele compete com o estrogênio pela ligação ao receptor de estrogênio, porém o complexo tamoxifeno-receptor possui pouco, ou nenhum, efeito sobre a expressão gênica. Consequentemente, a administração de tamoxifeno após cirurgia ou durante quimioterapia desacelera ou para o crescimento das células cancerosas remanescentes nos casos de câncer de mama dependentes do hormônio. Outro análogo de esteroide, o fármaco **mifepristona** (**RU486**), liga-se ao receptor de progesterona e bloqueia a ação desse hormônio, essencial para a implantação do óvulo fecundado no útero e, assim, age como contraceptivo.

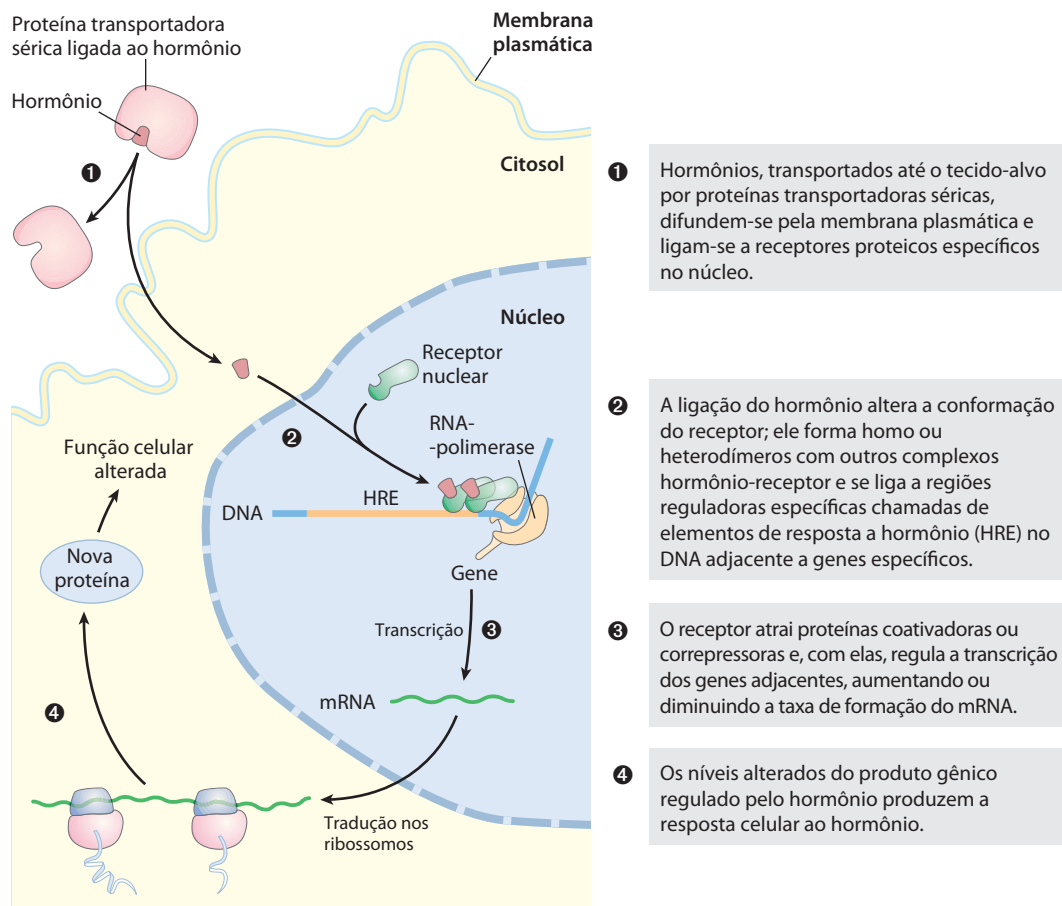
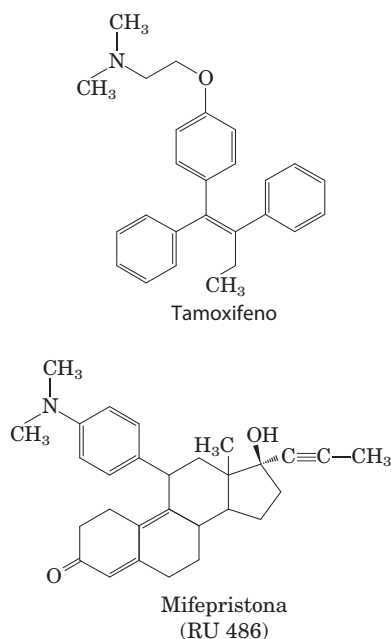



**FIGURA 12-30 Mecanismo geral por meio do qual os hormônios esteroides e da tireoide, retinoides e vitamina D regulam a expressão gênica.** Os detalhes da transcrição e síntese proteica estão descritos nos Capítulos 26 e 27. Alguns esteroides também agem por meio de receptores da membrana plasmática por um mecanismo completamente diferente.

Tamoxifeno

Mifepristona
(RU 486)

Certos efeitos dos esteroides parecem ocorrer rápido demais para serem resultantes da alteração da síntese de proteínas via mecanismo clássico de ação dos hormônios esteroides por meio de receptores nucleares. Por exemplo, a dilatação dos vasos sanguíneos mediada pelo estrogênio é sabidamente independente da transcrição gênica ou síntese proteica, assim como o é a redução na [cAMP] celular induzida por esteroides. Acredita-se que outro mecanismo de transdução de sinal envolvendo receptores da membrana plasmática seja o responsável por alguns desses efeitos.

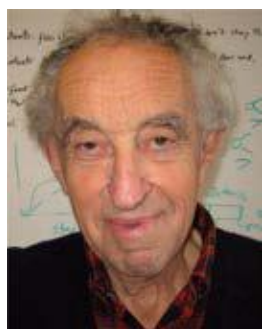
## RESUMO 12.8 Regulação da transcrição por receptores nucleares de hormônios

- Os hormônios esteroides entram nas células e se ligam a receptores proteicos específicos.
- O complexo hormônio-receptor se liga a regiões específicas do DNA, os elementos de resposta a hormônio, e interage com outras proteínas para regular a expressão dos genes próximos.
- Certos efeitos dos hormônios esteroides podem ocorrer por uma rota de sinalização diferente e mais rápida. ■

## 12.9 Sinalização em microrganismos e plantas

Muito do que se mencionou até agora sobre sinalização é pertinente aos tecidos de mamíferos, ou às células em cultura isoladas de tais tecidos. Bactérias, arquibactérias, microrganismos eucarióticos e plantas vasculares também devem responder a uma variedade de sinais externos – $O_2$, nutrientes, luz, substâncias químicas nocivas e assim por diante. Agora será realizado um breve exame dos tipos de maquinaria de sinalização utilizados por microrganismos e plantas.

### A sinalização bacteriana requer fosforilação em um sistema binário

Em estudos pioneiros sobre quimiotaxia em bactérias, Julius Adler mostrou que *Escherichia coli* responde aos nutrientes em seu ambiente, incluindo açúcares e aminoácidos, movendo-se em direção a eles, impulsionada por um ou mais flagelos. Uma família de proteínas de membrana tem domínios de ligação na face externa da membrana plasmática, aos quais **atraentes** específicos (açúcares ou aminoácidos) se ligam (**Figura 12-31**). A interação com o ligante leva à fosforilação em um resíduo de His do domínio citosólico de um receptor com atividade cinásica intrínseca. Esse primeiro componente do **sistema binário**, o **receptor histidina-cinase**, então catalisa a transferência do grupo fosfato do resíduo de His para um resíduo de Asp em uma segunda proteína, solúvel, o **regulador da resposta**. Essa fosfoproteína move-se até a base do flagelo, transferindo o sinal recebido pelo receptor da membrana. O flagelo é impulsionado por um motor giratório que pode impelir a célula através do meio ou pará-la, dependendo da direção da rotação do motor. A variação na concentração de atraente ao longo do tempo, sinalizada por meio do receptor, possibilita que a célula determine se está movendo-se na direção da fonte do atraente, ou se está afastando-se dele. Se o movimento estiver em direção ao atraente, o regulador da resposta sinaliza à célula para continuar em linha reta (corrida); se estiver afastando-se, a célula tropeça momentaneamente, adotando uma nova direção. A repetição desse comportamento resulta em uma rota aleatória, influenciada pelo movimento em direção à concentração aumentada do atraente.

Julius Adler

*E. coli* não detecta somente açúcares e aminoácidos, mas também $O_2$, extremos de temperatura e outros fatores ambientais, utilizando esse sistema binário básico. Os sistemas binários têm sido encontrados em muitas outras bactérias, gram-positivas e gram-negativas, e em arquibactérias, assim como em protistas e fungos. Esse mecanismo de sinalização, evidentemente, desenvolveu-se cedo no curso da evolução celular e tem se mantido.

Vários sistemas de sinalização utilizados por células animais também têm análogos em bactérias. À medida que sequências completas dos genomas de um maior número de bactérias diferentes tornam-se conhecidas, pesquisadores têm descoberto genes que codificam para proteínas similares às proteínas Ser-cinases ou Tyr-cinases, proteínas semelhantes a Ras reguladas pela ligação de GTP, e proteínas com domínios SH3. Os receptores Tyr-cinase ainda não foram encontrados em bactérias, mas resíduos de Ⓟ-Tyr de fato ocorrem em algumas bactérias.

**FIGURA 12-31 O mecanismo de sinalização binário na quimiotaxia bacteriana. (a)** Quando colocada próximo a uma fonte de um soluto atraente, a *E. coli* move-se de forma errática, tendendo na direção do atraente. **(b)** Os flagelos têm estruturas helicoidais intrínsecas, e quando todos os flagelos giram no sentido anti-horário, suas hélices torcem-se juntas e movem-se em concerto, propelindo a célula à frente, em uma "corrida". Quando os flagelos giram no sentido horário, os feixes de flagelos separam-se, e a célula escorrega momentaneamente até que a rotação no sentido anti-horário recomece e a célula volte a nadar adiante, em uma nova direção randômica. Quando a célula está movendo-se na direção do atraente, ela apresenta menos "tropeços", e, portanto, corridas mais longas; quando ela está se afastando, os frequentes tropeços resultam em movimento na direção do atraente. **(c)** A rotação dos flagelos é controlada por um sistema binário constituído por um receptor histidina-cinase e uma proteína efetora. Quando um ligante atraente liga-se ao domínio receptor do receptor ligado à membrana, uma proteína His-cinase no domínio citosólico (componente 1) é ativada e autofosforila um resíduo de His. Este grupo fosfato é, então, transferido a um resíduo de Asp do componente 2. Após a fosforilação, o componente 2 move-se até a base do flagelo, onde ele causa a rotação no sentido anti-horário dos flagelos, levando a uma corrida.

### Os sistemas de sinalização de plantas têm alguns dos mesmos componentes utilizados por micróbios e mamíferos

Como os animais, as plantas vasculares devem ter um meio de comunicação entre os tecidos para coordenar e dirigir

o crescimento e o desenvolvimento; para adaptarem-se às condições de $O_2$, nutrientes, temperatura e disponibilidade de água; e para alertar sobre a presença de agentes químicos nocivos e de patógenos (**Figura 12-32**). Pelo menos um bilhão de anos de evolução se passou desde que os ramos dos eucariotos para plantas e animais divergiram, o que se reflete nas diferenças em mecanismos de sinalização: alguns mecanismos vegetais são conservados – isto é, são similares àqueles dos animais (proteínas-cinases, proteínas adaptadoras, nucleotídeos cíclicos, bombas iônicas eletrogênicas e canais controlados por portões); alguns são similares aos sistemas binários das bactérias; e alguns são exclusivos das plantas (mecanismos sensíveis à luz que refletem as mudanças sazonais no ângulo e, portanto, na cor da luz solar, por exemplo) (Tabela 12-7). O genoma da planta *Arabidopsis thaliana* codifica cerca de 1.000 proteínas Ser/Thr-cinases, incluindo aproximadamente 60 MAPK e quase 400 receptores associados à membrana com atividade cinásica que fosforilam resíduos de Ser ou Thr; uma grande variedade de proteínas-fosfatases; proteínas adaptadoras que formam arcabouços sobre os quais proteínas agrupam-se em complexos de sinalização; enzimas para a síntese e a degradação de nucleotídeos cíclicos; e 100 ou mais canais iônicos, incluindo cerca de 20 controlados por nucleotídeos cíclicos. Os fosfolipídeos de inositol estão presentes, assim como as cinases que os interconvertem por meio da fosforilação dos grupos inositol. Mesmo considerando que a *Arabidopsis* tem múltiplas cópias de muitos

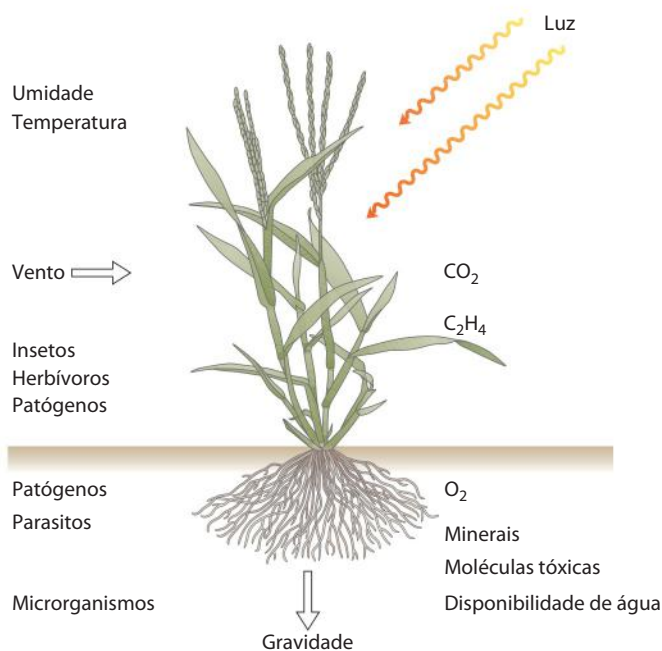



**FIGURA 12-32 Alguns estímulos que desencadeiam respostas em plantas.**

**TABELA 12-7 Componentes da sinalização presentes em mamíferos, plantas ou bactérias**

| Componente da sinalização | Mamíferos | Plantas | Bactérias |
|---|---|---|---|
| Canais iônicos | + | + | + |
| Bombas de íons eletrogênicas | + | + | + |
| His-cinases binárias | + | + | + |
| Adenilil-ciclase | + | + | + |
| Guanilil-ciclase | + | + | ? |
| Receptores proteínas-cinases (Ser/Thr) | + | + | ? |
| $Ca^{2+}$ como segundo mensageiro | + | + | ? |
| Canais de $Ca^{2+}$ | + | + | ? |
| Calmodulina, proteína de ligação a CaM | + | + | – |
| Cascata de MAPK | + | + | – |
| Canais controlados por nucleotídeos cíclicos | + | + | – |
| Canais de $Ca^{2+}$ controlados por $IP_3$ | + | + | – |
| Fosfatidilinositol-cinases | + | + | – |
| GPCR | + | +/– | + |
| Proteínas G triméricas | + | +/– | – |
| Fosfolipase C específica para PI | + | ? | – |
| Receptores tirosina-cinases | + | ? | – |
| Domínios SH2 | + | ? | ? |
| Receptores nucleares para esteroides | + | – | – |
| Proteína-cinase A | + | – | – |
| Proteína-cinase G | + | – | – |

genes, a presença desse grande número certamente reflete uma ampla gama de potencial para sinalização.

Entretanto, alguns tipos de proteínas de sinalização comuns aos tecidos animais não estão presentes em plantas, ou estão representados por apenas poucos genes. Por exemplo, as proteínas-cinases dependentes de nucleotídeos cíclicos (PKA e PKG) parecem estar ausentes. Os genes para as proteínas G heterotriméricas e Tyr-cinase são muito menos abundantes no genoma vegetal, e os genes para os GPCR, a maior família de proteínas do genoma humano (~1.000 genes), estão muito escassamente representados no genoma de plantas. Os receptores nucleares para esteroides que se ligam ao DNA certamente não são abundantes, e muitos podem estar ausentes em plantas. Embora as plantas careçam do mecanismo sensível à luz mais amplamente conservado presente nos animais (a rodopsina, que utiliza o retinal como pigmento), elas apresentam uma rica coleção de outros mecanismos para a detecção da luz, não encontrada nos tecidos animais – por exemplo, fitocromos e criptocromos (Capítulo 19).

Os tipos de componentes que induzem a sinalização em plantas são similares a certas moléculas sinalizadoras de animais (**Figura 12-33**). Em vez de prostaglandinas, as plantas utilizam jasmonato; em vez de hormônios esteroides, brassinoesteroides. Aproximadamente 100 pequenos peptídeos diferentes agem como sinalizadores em plantas, e ambos, plantas e animais, utilizam compostos derivados de aminoácidos aromáticos como sinalizadores.

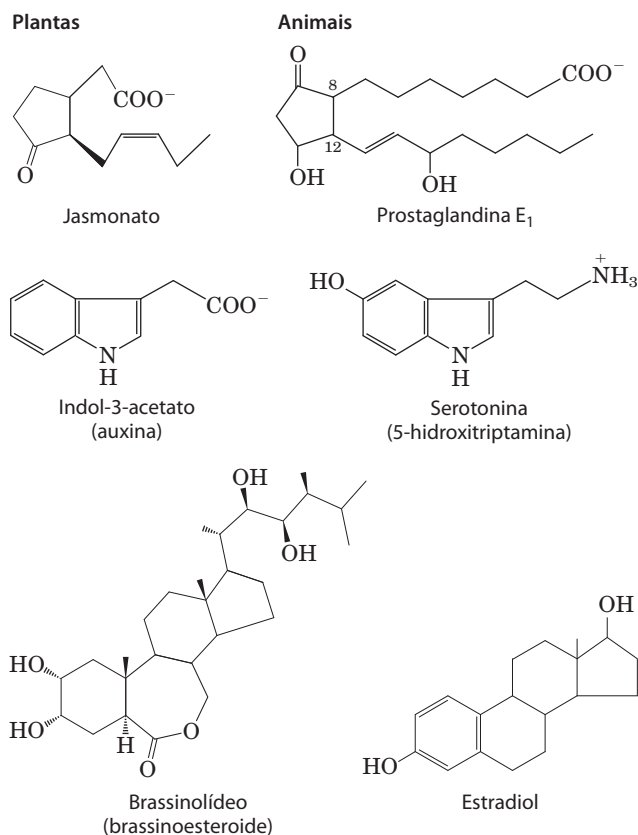



**FIGURA 12-33 Semelhanças estruturais entre moléculas sinalizadoras de plantas e animais.**

## As plantas detectam etileno por meio de um sistema binário e uma cascata de MAPK

O hormônio vegetal gasoso etileno ($CH_2{=}CH_2$), que estimula o amadurecimento dos frutos (entre outras funções), age por meio de receptores relacionados em sequência primária aos receptores His-cinases dos sistemas binários bacterianos e provavelmente tenham evoluído deles. Em *Arabidopsis*, o sistema de sinalização binário compreende uma única proteína integral da membrana do retículo endoplasmático (*não* da membrana plasmática). O etileno se difunde para dentro da célula pela membrana plasmática e então para dentro do RE. O primeiro componente a jusante modulado pela sinalização do etileno é uma proteína Ser/Thr-cinase (CTR1; **Figura 12-34**) com sequência homóloga a Raf, a proteína-cinase que inicia a cascata das MAPK na resposta de mamíferos à insulina (ver Figura 12-15). Em plantas, na ausência de etileno, a cinase CTR1 está ativa e *inibe* a cascata de MAPK, inibindo a transcrição dos genes responsivos a etileno. A exposição ao etileno *inativa* a cinase CTR1, ativando a cascata de MAPK que leva à ativação do fator de transcrição EIN3. O EIN3 ativo estimula a síntese de um segundo fator de trans-

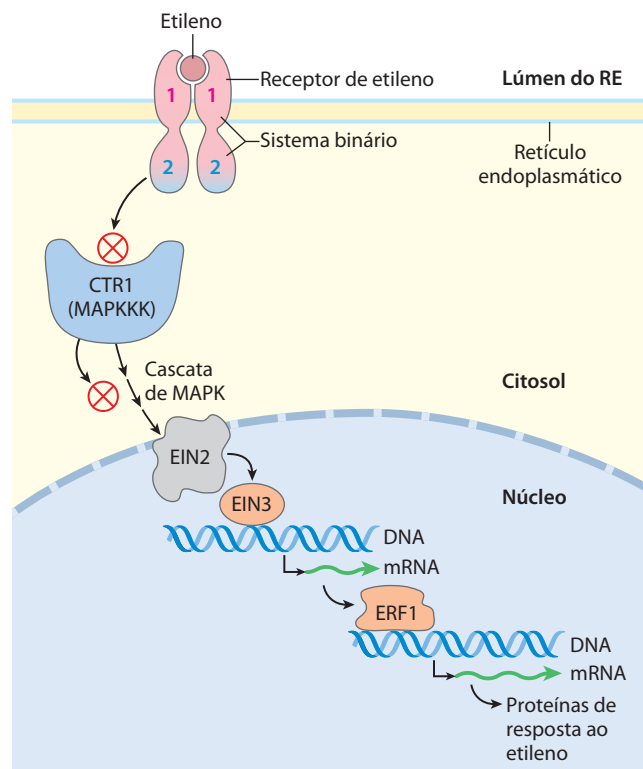



**FIGURA 12-34 Mecanismo de transdução para a detecção de etileno pelas plantas.** O receptor de etileno (em cor-de-rosa) no retículo endoplasmático é um sistema binário contido em uma única proteína, com um domínio receptor (componente 1) e um domínio regulador da resposta (componente 2). O receptor controla (de forma ainda desconhecida) a atividade de CTR1, uma proteína-cinase similar a MAPKKK e, portanto, presumivelmente parte de uma cascata de MAPK. O CTR1 é um regulador negativo da resposta ao etileno; quando CTR1 está *inativo*, o sinal do etileno é transmitido pelo produto gênico EIN2 (considerada uma proteína do envelope nuclear), causando um aumento na síntese do fator de transcrição ERF1. Este fator estimula a expressão de proteínas específicas para a resposta ao etileno.

crição (ERF1), que, por sua vez, ativa os genes responsivos ao etileno; os produtos gênicos alteram processos que vão desde o desenvolvimento das sementes até o amadurecimento dos frutos. Apesar de aparentemente derivado do sistema de sinalização binário bacteriano, o sistema do etileno em *Arabidopsis* é diferente porque a atividade His-cinásica que define o componente 1 em bactérias não é essencial à transdução de sinal em *Arabdopsis*.

## Proteínas-cinases semelhantes a receptores transduzem os sinais de peptídeos

Um elemento comum da sinalização em plantas envolve as **cinases semelhantes a receptores** (**RLK**, de *receptor-like kinases*), que têm um único segmento helicoidal na membrana plasmática que conecta um domínio receptor na face externa da célula com uma proteína Ser/Thr-cinase na face citoplasmática. Esse tipo de receptor participa dos mecanismos de defesa desencadeados pela infecção por patógenos bacterianos (**Figura 12-35a**). O sinal para ativar os genes necessários para a defesa contra a infecção é um peptídeo (flg22) liberado pela degradação da flagelina, a principal proteína do flagelo bacteriano. A ligação da flg22 ao receptor FLS2 da *Arabidopsis* induz a dimerização do receptor e a autofosforilação em resíduos de Ser e Thr, e o efeito a jusante é a ativação de uma cascata de MAPK como aquela descrita anteriormente para a ação da insulina. A cinase final nesta cascata ativa um fator de transcrição específico, iniciando a síntese das proteínas que defendem contra a infecção bacteriana. As etapas entre a fosforilação do receptor e a cascata de MAPK ainda não estão elucidadas. Uma fosfoproteína-fosfatase (KAPP) associa-se ao receptor ativo e o inativa por desfosforilação para extinguir a resposta.

**FIGURA 12-35 Semelhanças entre as rotas de sinalização que iniciam as respostas imunológicas em plantas e animais. (a)** Em *Arabidopsis thaliana*, o peptídeo flg22, derivado do flagelo de um patógeno bacteriano, liga-se ao seu receptor (FLS) na membrana plasmática, levando à formação de dímeros do receptor e causando a autofosforilação do domínio cinásico citosólico em um resíduo de Ser ou Thr (não em uma Tyr). Assim ativada, a proteína-cinase fosforila proteínas a jusante (não mostradas). O receptor ativado também ativa (por meios desconhecidos) uma cascata de MAPK, que leva à fosforilação de uma proteína nuclear que normalmente inibe os fatores de transcrição WRKY22 e 29; esta fosforilação causa a degradação proteolítica do inibidor e libera os fatores de transcrição para estimularem a expressão dos genes relacionados com a resposta imune. **(b)** Em mamíferos, um lipopolissacarídeo bacteriano tóxico (LPS; ver Figura 7-31) é detectado por receptores da membrana plasmática, que então se associam e ativam uma proteína-cinase solúvel (IRAK). A principal proteína flagelar de bactérias patogênicas age por meio de um receptor semelhante, também ativando IRAK. A IRAK ativada inicia duas cascatas de MAPK distintas que terminam no núcleo, levando à síntese das proteínas necessárias para a resposta imune. Jun, Fos e NFκB são fatores de transcrição.

A cascata de MAPK na defesa das plantas contra patógenos bacterianos é extraordinariamente similar à resposta imune inata em mamíferos (Figura 12-35b) iniciada pelo lipopolissacarídeo bacteriano e mediada por receptores tipo Toll (TLR, de *Toll-like receptors*, nome derivado de um mutante de *Drosophila* originalmente chamado de Toll [em alemão, "louco"]; os TLR foram posteriormente encontrados em muitos outros organismos e mostrou-se que agem durante o desenvolvimento embrionário). Outros receptores de membrana utilizam mecanismos similares para ativar uma cascata de MAPK, culminando na ativação de fatores de transcrição e consequente expressão de genes essenciais à resposta de defesa.

Presume-se que a maioria das várias centenas de RLK em plantas age de maneiras similares: a interação com o ligante induz a dimerização e a autofosforilação, e a cinase receptora ativada desencadeia as respostas subsequentes por meio da fosforilação de resíduos de Ser ou Thr em proteínas-chave.

## RESUMO 12.9 Sinalização em microrganismos e plantas

- As bactérias e os microrganismos eucarióticos têm diversos sistemas sensoriais que os permitem testar e responder ao ambiente. No sistema binário, um receptor His-cinase reconhece o sinal e autofosforila um resíduo de His, fosforilando então um resíduo de Asp do regulador da resposta.
- As plantas respondem a muitos estímulos ambientais e fazem uso de hormônios e fatores de crescimento para coordenar o desenvolvimento e as atividades metabólicas de seus tecidos. Os genomas vegetais codificam centenas de proteínas de sinalização, incluindo algumas muito similares às de mamíferos.
- Mecanismos de sinalização binários, comuns em bactérias, são encontrados em formas modificadas em plantas, utilizados na detecção de luz e de sinais químicos.
- As cinases semelhantes a receptores (RLK) de plantas participam da detecção de uma grande variedade de estímulos, incluindo brassinoesteroides, peptídeos originados de patógenos e sinais de desenvolvimento. As RLK autofosforilam resíduos de Ser/Thr, e então ativam proteínas a jusante, que, em alguns casos, são cascatas de MAPK. O resultado final é o aumento da transcrição de genes específicos.

## 12.10 Transdução sensorial na visão, no olfato e no paladar

A detecção de luz, odores e sabores (visão, olfato e paladar, respectivamente) em animais é realizada por neurônios sensoriais especializados que utilizam mecanismos de transdução de sinal fundamentalmente similares àqueles que detectam hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento. Um sinal sensorial inicial é bastante amplificado por mecanismos que incluem canais iônicos controlados por portões e segundos mensageiros intracelulares; o sistema se adapta à estimulação contínua alterando sua sensibilidade ao estímulo (dessensibilização); e as informações sensoriais vindas de diversos receptores são integradas antes do sinal final ser enviado ao cérebro.

### O sistema visual utiliza os mecanismos via GPCR clássicos

A luz que entra por meio da pupila do olho dos vertebrados é irradiada sobre um grupo altamente organizado de neurônios sensíveis à luz (**Figura 12-36**). Esses neurônios sensíveis à luz são de dois tipos: bastonetes (cerca de $10^9$ por retina), que são sensíveis a baixos níveis de luz, mas não conseguem discriminar as cores, e cones (cerca de $3 \times 10^6$ por retina), que são menos sensíveis à luz, mas podem diferenciar as cores. Os dois tipos celulares são neurônios sensoriais especializados longos e estreitos, com dois compartimentos celulares distintos: o segmento externo contém dúzias de discos membranosos carregados com receptores proteicos e o cromóforo fotossensível **retinal**; o segmento interno contém o núcleo e muitas mitocôndrias, que produzem o ATP essencial para a fototransdução.

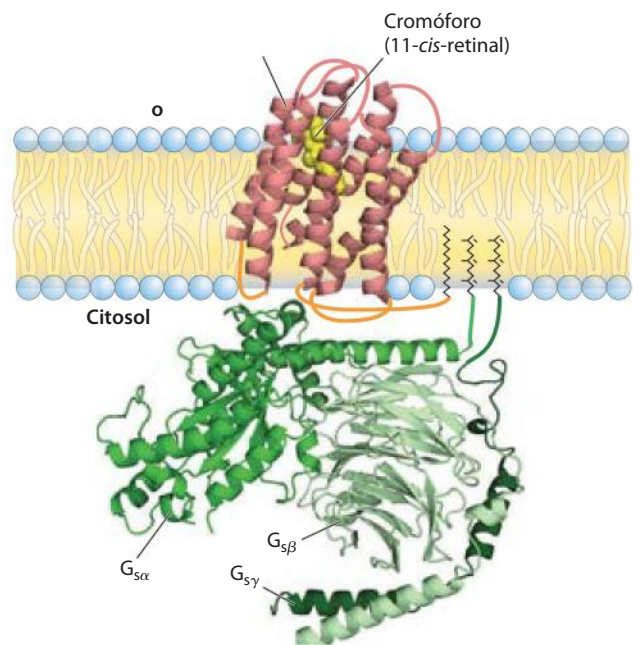
**FIGURA 12-36 Recepção da luz no olho dos vertebrados.** O cristalino foca a luz sobre a retina, composta por camadas de neurônios. Os neurônios fotossensoriais primários são bastonetes (em amarelo), responsáveis pela alta resolução da visão e pela visão noturna, e cones de três subtipos (em cor salmão), que iniciam a visão colorida. Os bastonetes e cones formam sinapses com diversas fileiras de neurônios interconectores que transmitem e integram sinais elétricos. Os sinais, por fim, passam dos neurônios ganglionares, por meio do nervo óptico, ao cérebro. Observe que a luz deve passar pelas camadas de neurônios ganglionares e neurônios interconectores antes de atingir os cones e bastonetes.

Como outros neurônios, bastonetes e cones apresentam um potencial elétrico transmembrana ($V_m$), produzido pelo bombeamento eletrogênico da $Na^+K^+$-ATPase da membrana plasmática do segmento interno (**Figura 12-37**). Também contribui para o potencial de membrana um canal iônico do segmento externo que permite a passagem tanto de $Na^+$ quanto de $Ca^{2+}$ e que é controlado (aberto) por cGMP. No escuro, os cones contêm cGMP suficiente para manter esse canal aberto. O potencial de membrana é, portanto, determinado pela diferença entre a quantidade de $Na^+$ e $K^+$ bombeados pelo segmento interno (que polariza a membrana) e pelo influxo de $Na^+$ pelo canal iônico do segmento externo (que tende a despolarizar a membrana).

O princípio da sinalização nos bastonetes ou nos cones é uma redução na [cGMP] induzida pela luz, que causa o fechamento do canal iônico controlado por cGMP. A membrana plasmática, então, torna-se hiperpolarizada pela $Na^+K^+$-ATPase. Os bastonetes e cones formam sinapses com neurônios interconectores (Figura 12-36) que transmitem a informação sobre a atividade elétrica para os neurônios ganglionares próximos da superfície interna da retina. Os neurônios ganglionares integram as informações provenientes de muitos bastonetes ou cones e enviam o sinal resultante, pelo nervo óptico, ao córtex visual do cérebro.

A transdução da visão inicia quando a luz incide na rodopsina, da qual muitos milhares de moléculas estão presentes em cada um dos discos do segmento externo dos bastonetes e cones. A **rodopsina** ($M_r$ 40.000) é uma proteína integral de membrana com sete hélices $\alpha$ que cruzam a membrana (**Figura 12-38**), a arquitetura característica dos GPCR. O pigmento absorvente de luz (cromóforo) 11-*cis*-retinal é covalentemente unido à **opsina**, a proteína componente da rodopsina, por meio da formação de uma base de Schiff com um resíduo de Lys. A molécula de retinal situa-se próximo ao meio da bicamada (Figura 12-38), orientada com seu eixo longo aproximadamente no plano da membrana. Quando um fóton é absorvido pelo componente retinal da rodopsina, a energia causa uma alteração fotoquímica; 11-*cis*-retinal é convertido a retinal-todo-*trans* (ver Figuras 1-19b e 10-21). Essa alteração na estrutura do cromóforo força mudanças conformacionais na molécula de rodopsina – o primeiro estágio da transdução visual.

O retinal é derivado da vitamina $A_1$ (retinol), produzida a partir de $\beta$-caroteno (ver Figura 10-21). A deficiência de vitamina A na dieta leva à cegueira noturna (a incapacidade de adaptar-se a baixos níveis de luz), relativamente comum em alguns países em desenvolvimento. Suplementos de vitamina A ou alimentos ricos em caroteno (como cenoura) suprem a vitamina A e revertem a cegueira noturna. ■

**FIGURA 12-37 Hiperpolarização dos bastonetes induzida pela luz.** Os bastonetes são compostos por um segmento externo, preenchido com pilhas de discos membranosos (não mostrado) contendo o fotorreceptor rodopsina, e um segmento interno, que contém o núcleo e outras organelas (não mostrado). O segmento interno forma sinapses com neurônios interconectores (ver Figura 12-36). Os cones apresentam uma estrutura similar. O ATP do segmento interno impulsiona a $Na^+K^+$-ATPase, que cria um potencial elétrico transmembrana bombeando 3 $Na^+$ para fora da célula para cada 2 $K^+$ bombeados para dentro. O potencial de membrana é reduzido pelo influxo de $Na^+$ e $Ca^{2+}$ por meio de canais de cátions controlados por cGMP na membrana plasmática do segmento externo. Quando a rodopsina absorve luz, ela provoca a degradação do cGMP (pontos verdes) no segmento externo, causando o fechamento do canal iônico. Sem o influxo de cátions por este canal, a célula torna-se hiperpolarizada. Este sinal elétrico passa para o cérebro pelas fileiras de neurônios mostradas na Figura 12-36.

**Complexo da rodopsina com a proteína G transducina.** (PDB ID 1BAC) A rodopsina (em vermelho) tem sete hélices transmembrana inseridas nas membranas dos discos dos segmentos externos dos bastonetes, estando orientada com a extremidade carboxiterminal na face citosólica e a aminoterminal dentro do disco. O cromóforo 11-*cis*-retinal (estrutura em amarelo em volume atômico), unido pela formação de uma base de Schiff com a $Lys^{256}$ da sétima hélice, situa-se próximo ao centro da bicamada. (Esta localização é similar àquela do sítio de ligação da adrenalina no receptor $\beta$-adrenérgico.) Diversos resíduos de Ser e Thr próximos à extremidade carboxiterminal são substratos para as fosforilações que são parte do mecanismo de dessensibilização da rodopsina. As alças citosólicas que interagem com a proteína G transducina estão mostradas em cor de laranja; as posições exatas ainda não são conhecidas. As três subunidades da transducina (em verde) estão mostradas em sua provável disposição. A rodopsina é palmitoilada na extremidade carboxiterminal, e as subunidades $\alpha$ e $\gamma$ da transducina são unidas a lipídeos (em amarelo) que auxiliam no ancoramento na membrana.

## A rodopsina excitada age por meio da proteína G transducina para reduzir a concentração de cGMP

Na conformação excitada, a rodopsina interage com uma segunda proteína, **transducina**, que está suspensa próximo à face citoplasmática da membrana do disco (Figura 12-38). A transducina (T) pertence à mesma família de proteínas heterotriméricas ligadoras de GTP, como $G_s$ e $G_i$. Apesar de ser especializada na transdução visual, a transducina compartilha muitas características funcionais com $G_s$ e $G_i$. Ela pode ligar-se tanto a GDP quanto a GTP. No escuro, li-

gada a GDP, as três subunidades da proteína ($T_\alpha$, $T_\beta$ e $T_\gamma$) permanecem unidas, e nenhum sinal é enviado. Quando a rodopsina é excitada pela luz, ela interage com a transducina, catalisando a substituição do GDP por GTP do citosol (**Figura 12-39**, etapas ❶ e ❷). A transducina, então, dissocia-se em $T_\alpha$ e $T_{\beta\gamma}$, e a $T_\alpha$-GTP transmite o sinal do receptor excitado para o próximo elemento da rota de transdução, uma cGMP-fosfodiesterase; esta enzima converte cGMP a 5'-GMP (etapas ❸ e ❹). Observe que esta não é a mesma fosfodiesterase de nucleotídeo cíclico que hidrolisa o cAMP para o término da resposta $\beta$-adrenérgica. Uma isoforma de PDE específica para cGMP é exclusiva das células visuais da retina.

A PDE da retina é uma proteína periférica com o sítio ativo na face citoplasmática da membrana do disco. No escuro, uma subunidade inibitória firmemente ligada suprime de maneira muito eficaz a atividade da PDE. Quando a $T_\alpha$-GTP encontra a PDE, a subunidade inibitória deixa a enzima e liga-se à $T_\alpha$, e a atividade da enzima imediatamente aumenta em algumas ordens de magnitude. Cada molécula da PDE ativa degrada muitas moléculas de cGMP ao biologicamente inativo 5'-GMP, diminuindo a [cGMP] no segmento externo em uma fração de segundo. Nessa nova [cGMP] mais baixa, o canal iônico controlado por cGMP fecha, bloqueando a reentrada de $Na^+$ e $Ca^{2+}$ para o segmento externo e hiperpolarizando a membrana do bastonete ou cone (etapa ❺). Por meio desse processo, o estímulo inicial – um fóton – modifica o $V_m$ da célula. Quanto maior a iluminação do bastonete, maior a sua hiperpolarização. A hiperpolarização é percebida pelos neurônios interconectores da retina, que passam o sinal integrado para as células ganglionares, as quais emitem axônios para o cérebro por meio do nervo óptico.

Algumas das etapas do processo de transdução visual resultam em uma gigantesca amplificação do sinal. Cada molécula de rodopsina excitada ativa pelo menos 500 mo-

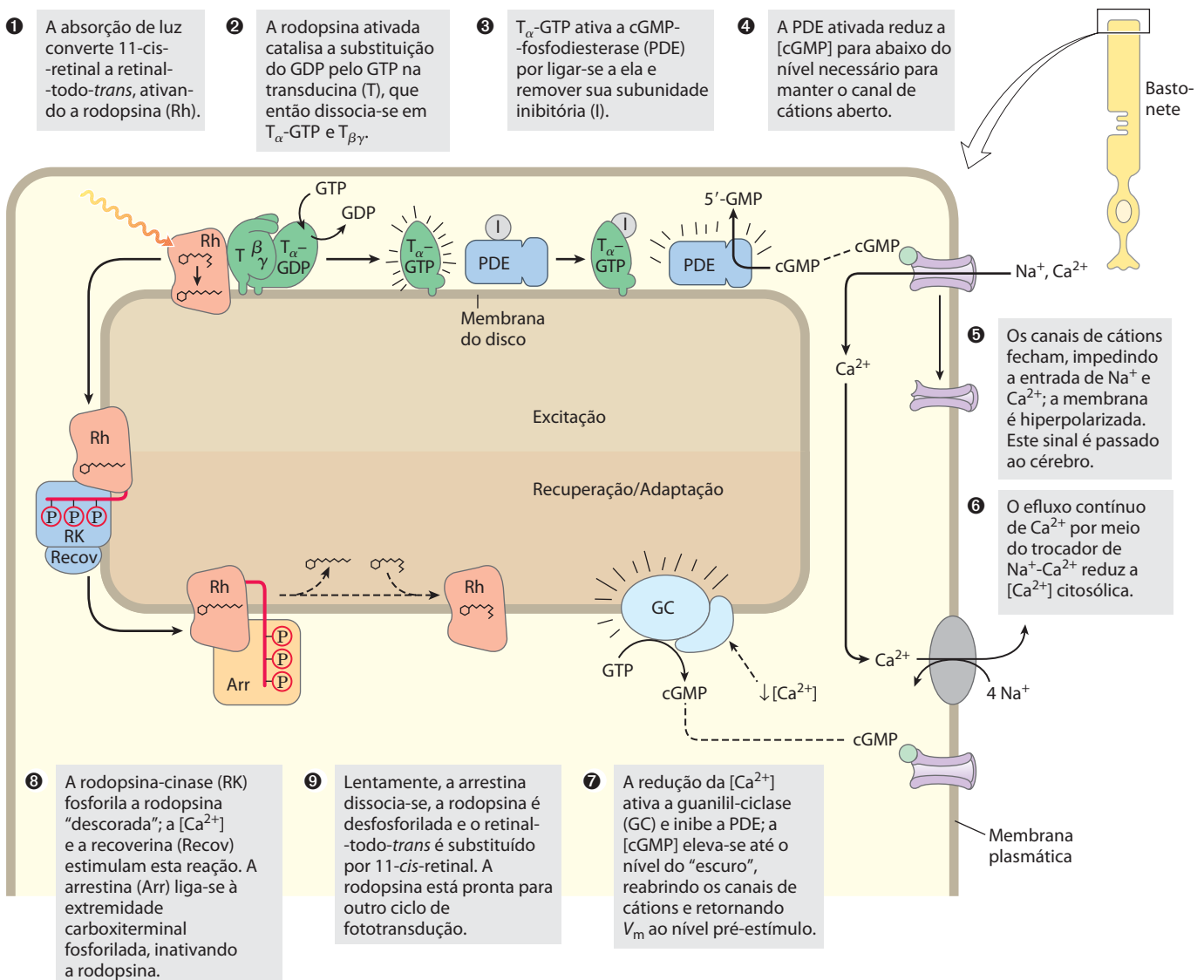



**FIGURA 12-39 Consequências moleculares da absorção do fóton pela rodopsina no segmento externo do bastonete.** A metade superior da figura (etapas ❶ a ❺) descreve a excitação; a inferior mostra as etapas após a iluminação: a recuperação (etapas ❻ e ❼) e a adaptação (etapas ❽ e ❾).

léculas de transducina, cada uma das quais podendo ativar uma molécula de PDE. Essa fosfodiesterase tem uma taxa de processamento extraordinariamente alta, cada molécula ativada hidrolisando 4.200 moléculas de cGMP por segundo. A ligação de cGMP aos canais iônicos controlados por cGMP é cooperativa, e uma variação relativamente pequena na [cGMP], portanto, resulta em uma grande alteração da condutância iônica. O resultado dessas amplificações é uma excelente sensibilidade à luz. A absorção de um único fóton fecha 1.000 ou mais canais iônicos e altera o potencial de membrana da célula em cerca de 1 mV.

## O sinal visual é rapidamente terminado

À medida que seus olhos movem-se ao longo desta linha, as imagens na retina das primeiras palavras desaparecem rapidamente – antes de você ver a próxima série de palavras. Nesse curto intervalo, muitos fenômenos bioquímicos aconteceram. Muito rapidamente após o término da iluminação dos bastonetes ou cones, o sistema fotossensível se desliga. A subunidade $\alpha$ da transducina (ligada a GTP) tem atividade GTPásica intrínseca. Dentro de milissegundos após a redução na intensidade da luz, o GTP é hidrolisado e $T_\alpha$ reassocia-se com $T_{\beta\gamma}$. A subunidade inibitória da PDE, que estava ligada a $T_\alpha$-GTP, é liberada e reassocia-se com a enzima, inibindo fortemente sua atividade.

Para retornar a [cGMP] ao nível do "escuro", a enzima guanilil-ciclase converte GTP a cGMP (etapa ❼ da Figura 12-39) em uma reação que é inibida pela alta [$Ca^{2+}$] (>100 nM). Os níveis de cálcio diminuem durante a iluminação, porque a [$Ca^{2+}$] do estado de equilíbrio no segmento externo é o resultado do bombeamento de $Ca^{2+}$ para fora da célula pelo trocador de $Na^+$-$Ca^{2+}$ (ver Figura 12-37) e do influxo de $Ca^{2+}$ por meio dos canais controlados por cGMP abertos. No escuro, isso gera uma [$Ca^{2+}$] de aproximadamente 500 nM – suficiente para inibir a síntese de cGMP. Após uma breve iluminação, a entrada de $Ca^{2+}$ é reduzida e a [$Ca^{2+}$] diminui (etapa ❻). A inibição da guanilil-ciclase pelo $Ca^{2+}$ é revertida, a ciclase converte GTP a cGMP e o sistema retorna ao estado pré-estímulo (etapa ❼).

A própria rodopsina também é alterada em resposta à iluminação prolongada. A mudança conformacional induzida pela absorção da luz expõe alguns resíduos de Thr e Ser no domínio carboxiterminal. Esses resíduos são rapidamente fosforilados pela **rodopsina-cinase** (etapa ❽ da Figura 12-39), que é funcional e estruturalmente homóloga à cinase $\beta$-adrenérgica ($\beta$ARK) que dessensibiliza o receptor $\beta$-adrenérgico (Figura 12-8). A proteína ligante de $Ca^{2+}$ **recoverina** inibe a rodopsina-cinase em altas [$Ca^{2+}$], mas a inibição é revertida quando a [$Ca^{2+}$] diminui após a iluminação, como descrito anteriormente. O domínio carboxiterminal fosforilado da rodopsina é ligado pela proteína **arrestina 1**, impedindo a interação adicional entre a rodopsina ativada e a transducina. A arrestina 1 é um homólogo muito próximo da arrestina 2 ($\beta$arr; Figura 12-8). Em uma escala de tempo relativamente longa (segundos a minutos), o retinal todo *trans* de uma molécula de rodopsina ativada é removido e substituído por 11-*cis*-retinal, reciclando a rodopsina para outro ciclo de excitação (etapa ❾ da Figura 12-39).

## Cones são especializados em visão colorida

A visão colorida envolve uma rota de transdução sensorial nos cones que é essencialmente idêntica àquela descrita anteriormente, porém iniciada por fotorreceptores ligeiramente diferentes. Três tipos de cones são especializados na detecção da luz de diferentes regiões do espectro, utilizando três proteínas fotorreceptoras relacionadas (opsinas). Cada cone expressa somente um tipo de opsina, mas cada um desses tipos é estreitamente relacionado à rodopsina em tamanho, sequência de aminoácidos e, presumivelmente, estrutura tridimensional. As diferenças entre as opsinas, entretanto, são grandes o bastante para colocarem o cromóforo, 11-*cis*-retinal, em três ambientes levemente diferentes, com o resultado que os três fotorreceptores apresentam espectros de absorção diferentes (**Figura 12-40**). Cores e tons são diferenciados por meio da integração das informações vindas dos três tipos de cones, cada um contendo um dos três tipos de receptores.

O daltonismo, ou seja, a incapacidade de distinguir entre vermelho e verde, é uma característica genética hereditária relativamente comum em humanos. Os diversos tipos de daltonismo são o resultado de diferentes tipos de mutações na opsina. Uma das formas é devida à perda do fotorreceptor para vermelho; os indivíduos afetados são **dicromatas vermelho**⁻ (enxergam apenas duas das cores primárias). Outros carecem do pigmento verde e são **dicromatas verde**⁻. Em alguns casos, os fotorreceptores para vermelho e verde estão presentes, mas apresentam uma alteração na sequência de aminoácidos que causa uma mudança no espectro de absorção, resultando na visão anormal das cores. Dependendo de qual pigmento estiver alterado, os indivíduos são **tricromatas com anomalia para o vermelho** ou **tricromatas com anomalia para o verde**. O estudo dos genes dos receptores visuais possibilitou o diagnóstico do daltonismo em um famoso "paciente" mais de um século após a sua morte (Quadro 12-4). ■

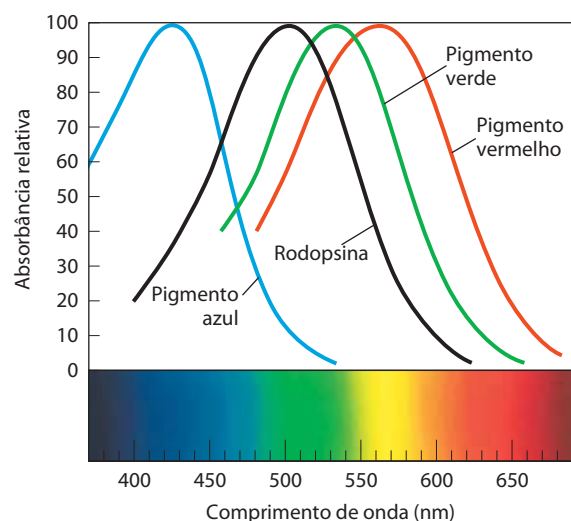



**FIGURA 12-40 O espectro de absorção da rodopsina purificada e dos receptores para vermelho, verde e azul dos cones.** Os espectros dos receptores, obtidos a partir de cones individuais isolados de cadáveres, apresentam picos em cerca de 420, 530 e 560 nm, e a máxima absorção da rodopsina é em aproximadamente 500 nm. Para referência, o espectro visível dos humanos é de cerca de 380 a 750 nm.

**QUADRO 12-4**  **MEDICINA** **Daltonismo: o experimento de John Dalton após a sua morte**

O químico John Dalton (famoso pela teoria atômica) era daltônico. Ele imaginava ser provável que o humor vítreo de seus olhos (o fluido que preenche o globo ocular atrás do cristalino) fosse de cor azulada, diferentemente do fluido incolor dos olhos normais. Ele propôs que, após sua morte, seus olhos fossem dissecados e a cor do humor vítreo determinada. Seu desejo foi cumprido. No dia seguinte à morte de Dalton, em julho de 1844, Joseph Ransome dissecou os olhos e descobriu que o humor vítreo era perfeitamente incolor. Ransome, como muitos cientistas, era relutante em jogar amostras no lixo. Ele colocou os olhos de Dalton em um frasco com preservativo, onde permaneceram por um século e meio (Figura Q-1).

Então, na metade da década de 1990, biólogos moleculares na Inglaterra retiraram pequenas amostras das retinas de Dalton e extraíram o DNA. Utilizando as conhecidas sequências dos genes das opsinas dos receptores para luz vermelha e verde, eles amplificaram as sequências relevantes (utilizando as técnicas descritas no Capítulo 9) e determinaram que Dalton tinha o gene da opsina para o fotopigmento vermelho, mas carecia do gene da opsina para o fotopigmento verde. Dalton era um dicromata verde. Assim, 150 anos depois de sua morte, o experimento que Dalton iniciou – conjeturando sobre a causa de seu daltonismo – foi finalmente terminado.

**FIGURA Q-1** Os olhos de Dalton.

## O olfato e o paladar dos vertebrados utilizam mecanismos similares ao sistema visual

As células sensoriais que detectam odores e sabores têm muito em comum com os bastonetes e os cones. Os neurônios olfativos têm cílios longos e finos que se estendem a partir de uma extremidade da célula para dentro de uma camada de muco que recobre a célula. Esses cílios representam uma grande área de superfície para a interação com os sinais olfativos. Os receptores para os estímulos olfativos são proteínas da membrana ciliar com a familiar estrutura dos GPCR de sete hélices $\alpha$ transmembrana. O sinal olfativo pode ser qualquer um dos muitos compostos voláteis para os quais existem receptores proteicos específicos. Nossa capacidade para discriminar odores é devida às centenas de diferentes receptores olfativos na língua e nas vias nasais, e à capacidade cerebral de integrar as informações vindas de diferentes tipos de receptores olfativos para o reconhecimento de um padrão "híbrido", estendendo nossa gama de discriminação para muito além do número de receptores.

O estímulo olfativo chega às células sensoriais pela difusão no ar. Na camada de muco que recobre os neurônios olfativos, a molécula odorante liga-se diretamente a um receptor olfativo ou liga-se a uma proteína específica que transporta o odorante até o receptor (**Figura 12-41**). A interação entre odorante e receptor provoca uma alteração na conformação do receptor que resulta na substituição do GDP por GTP em uma proteína G, $G_{olf}$, análoga à transducina e à $G_s$ do sistema $\beta$-adrenérgico. A $G_{olf}$ ativada, então, ativa a adenilil-ciclase da membrana ciliar, que sintetiza cAMP a partir de ATP, elevando a [cAMP] local. Os canais de $Na^+$ e $Ca^{2+}$ controlados por cAMP da membrana ciliar se abrem, e a entrada de $Na^+$ e $Ca^{2+}$ causa uma pequena despolarização, chamada de **potencial do receptor**. Se um número suficiente de moléculas odorantes encontra os receptores, o potencial do receptor será forte o bastante para induzir um neurônio a disparar um potencial de ação. Isso é transmitido ao cérebro em diversas etapas e registrado como um odor específico. Todos esses eventos acontecem em 100 a 200 ms.

Quando o estímulo olfativo não está mais presente, a maquinaria de transdução se desliga de diferentes maneiras. Uma cAMP-fosfodiesterase retorna a [cAMP] ao nível pré-estímulo. A $G_{olf}$ hidrolisa o GTP a GDP, portanto, inativando-se. A fosforilação do receptor por uma cinase específica impede sua interação com a $G_{olf}$, por um mecanismo análogo àquele utilizado para dessensibilizar o receptor $\beta$-adrenérgico e a rodopsina. E, por último, alguns odorantes são enzimaticamente destruídos por oxidases.

O sentido do paladar em vertebrados reflete a atividade dos neurônios gustativos agrupados nas papilas gustativas da superfície da língua. Nesses neurônios sensoriais, GPCR estão acoplados à proteína G heterotrimérica **gostoducina** (muito semelhante à transducina dos bastonetes e cones). As moléculas de sabor doce são aquelas que se ligam aos receptores em papilas gustativas "doces". Quando a molécula (de sabor) se liga, a gostoducina é ativada pela substituição do GDP por GTP, estimulando então a produção de cAMP pela adenilil-ciclase. A resultante elevação na [cAMP] ativa a PKA, que fosforila canais de $K^+$ na membrana plasmática, causando seu fechamento. A redução na saída de $K^+$ despolariza a célula (**Figura 12-42**), enviando um sinal elétrico para o cérebro. Outras papilas gustativas são especializadas na detecção de moléculas de sabor amargo, azedo, salgado ou umami (o sabor de certos aminoácidos, como o glutamato), utilizando várias combinações de segundos mensageiros e canais iônicos nos mecanismos de transdução.

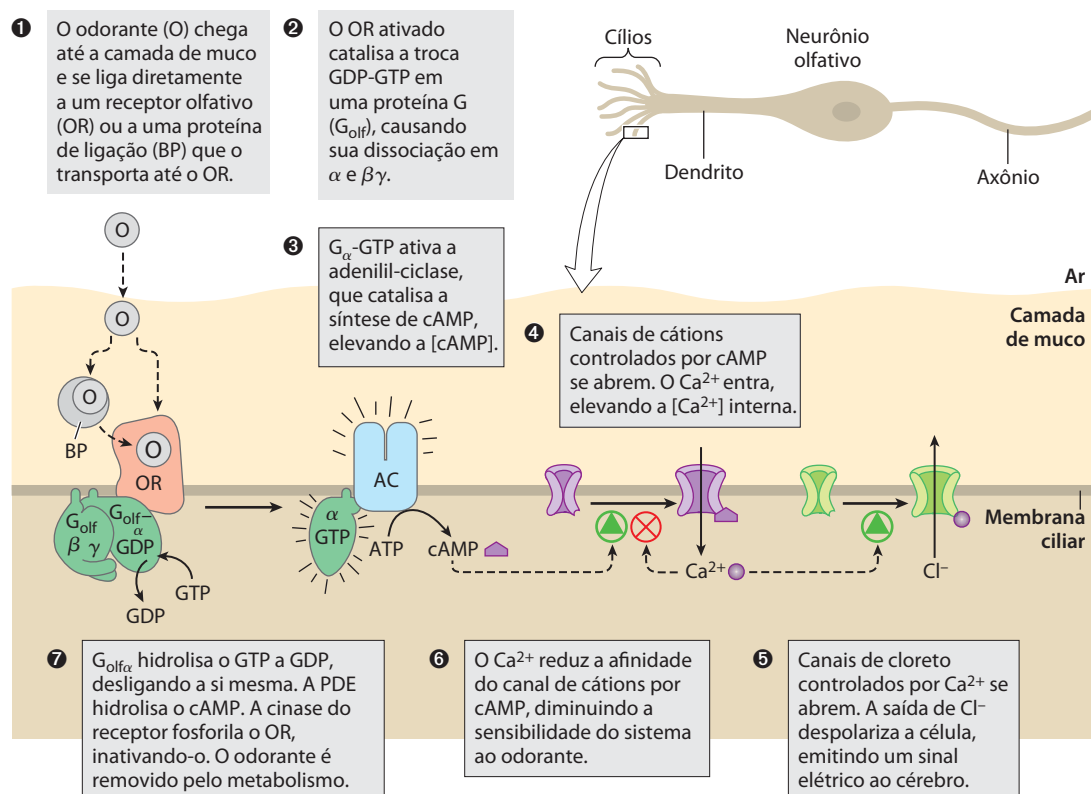



**FIGURA 12-41** **Os eventos moleculares do olfato.** Estas interações ocorrem nos cílios das células receptoras do olfato.

## Os GPCR dos sistemas sensoriais compartilham algumas características com os GPCR dos sistemas de sinalização por hormônios

Até o presente momento, foram analisados diversos tipos de sistemas de sinalização (sinalização hormonal, visão, olfato e paladar) nos quais receptores de membrana estão acoplados, por meio de proteínas G, a enzimas que produzem segundos mensageiros. Como já foi sugerido neste texto, os mecanismos de sinalização devem ter surgido nos primórdios da evolução; estudos genômicos têm revelado centenas de genes codificando GPCR em vertebrados,

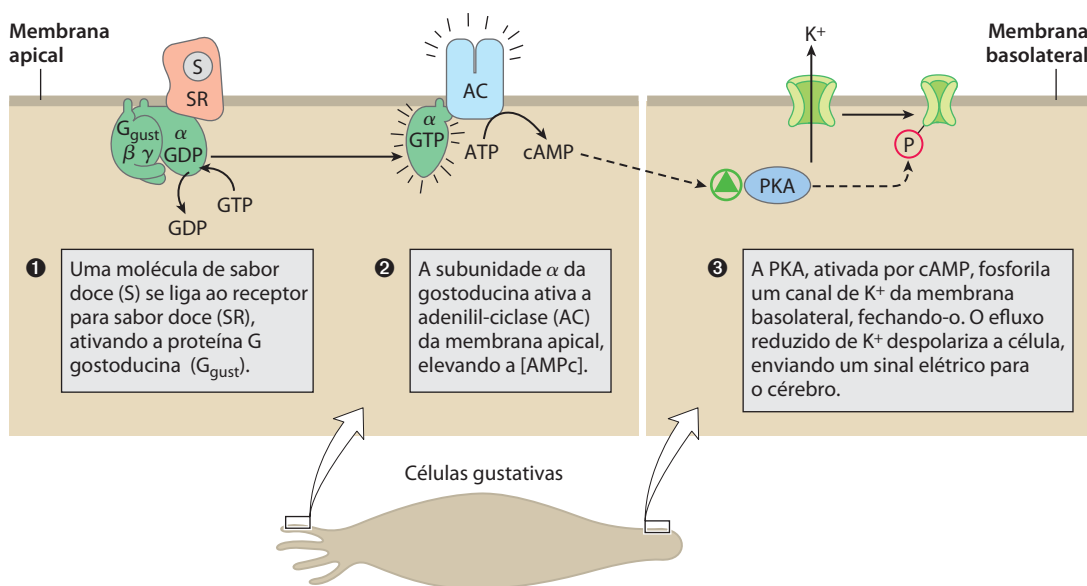



**FIGURA 12-42** **Mecanismo de transdução para sabores doces.**

em artrópodes (*Drosophila* e mosquito) e no nematódeo *Caenorhabditis elegans*. Mesmo a levedura comum *Saccharomyces* utiliza GPCR e proteínas G para detectar o tipo sexual oposto. Padrões gerais têm sido conservados, e a introdução de diversidade tem dado aos organismos modernos a capacidade de responder a uma ampla gama de estímulos (Tabela 12-8). Dos aproximadamente 29.000 genes no genoma humano, cerca de 1.000 codificam GPCR, incluindo centenas para os estímulos do olfato e muitos “receptores órfãos” para os quais o ligante natural ainda não é conhecido.

Todos os sistemas de transdução de sinal bem estudados que agem por meio de proteínas G heterotriméricas compartilham algumas propriedades comuns, que refletem sua relação evolutiva (**Figura 12-43**). Os receptores têm sete segmentos transmembrana, um domínio (geralmente a alça entre as hélices transmembrana 6 e 7) que interage com uma proteína G e um domínio carboxiterminal citoplasmático reversivelmente fosforilado em alguns resíduos de Ser ou Thr.

O sítio de interação com o ligante (ou, no caso de recepção da luz, o receptor de luz) está profundamente inserido na membrana e é composto por resíduos de diferentes segmentos transmembrana. A interação com o ligante (ou a luz) induz uma alteração na conformação do receptor, expondo um domínio que pode interagir com uma proteína G. As proteínas G heterotriméricas ativam ou inibem enzimas efetoras (adenilil-ciclase, PDE ou PLC), que afetam a concentração de um segundo mensageiro (cAMP, cGMP, $IP_3$ ou $Ca^{2+}$). Nos sistemas detectores de hormônios, o produto final é uma proteína-cinase ativada que regula algum processo celular por meio da fosforilação de uma proteína fundamental àquele processo.

**TABELA 12-8** Alguns sinais que agem por meio de GPCR

| Classe | Sinais |
|---|---|
| **Aminas** | Acetilcolina (muscarínico)<br>Dopamina<br>Epinefrina/adrenalina<br>Histamina<br>Serotonina |
| **Peptídeos** | Angiotensina<br>Bombesina<br>Bradicinina<br>Quimiocina(s)<br>Colecistocinina (CCK)<br>Endotelina<br>Hormônio liberador de gonadotrofina<br>Interleucina-8<br>Melanocortina<br>Neuropeptídeo Y<br>Neurotensina<br>Opioides<br>Orexina<br>Somatostatina<br>Taquicinina<br>Hormônio liberador de tireotropina<br>Urotensina II |
| **Hormônios proteicos** | Hormônio folículo-estimulante<br>Gonadotrofina<br>Hormônio coriônico gonadotrófico-lutropina<br>Tireotropina |
| **Prostanoides** | Prostaciclina(s)<br>Prostaglandina(s)<br>Tromboxano |
| **Outros** | Canabinoides<br>Lisoesfingolipídeos<br>Melatonina<br>Estímulos olfatórios<br>Rodopsina |

Nos neurônios sensoriais, o produto final é uma variação no potencial de membrana e um consequente sinal elétrico, que passa para outro neurônio da rota que conecta a célula sensorial ao cérebro.

Todos esses sistemas são autoinativantes. O GTP é convertido a GDP pela atividade GTPásica intrínseca das proteínas G, frequentemente aumentada pelas proteínas

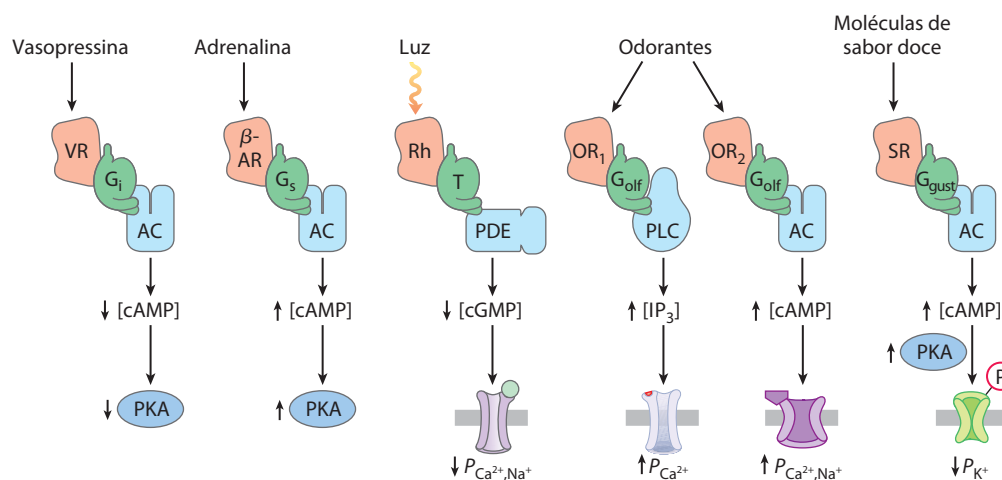



**FIGURA 12-43 Características comuns dos sistemas de sinalização que detectam hormônios, luz, odores e sabores.** Os GPCR garantem a especificidade ao sinal, e sua interação com as proteínas G provê a amplificação do sinal. As proteínas G heterotriméricas ativam as enzimas efetoras: adenilil-ciclase (AC), fosfolipase C (PLC) e fosfodiesterases (PDE) que degradam cAMP ou cGMP. As variações na concentração dos segundos mensageiros (cAMP, cGMP, $IP_3$) resultam na alteração de atividades enzimáticas por fosforilação ou alterações na permeabilidade (*P*) das membranas da superfície celular a $Ca^{2+}$, $Na^+$ e $K^+$. A resultante despolarização ou hiperpolarização da célula sensorial (o sinal) passa por grupos de neurônios aos centros sensoriais do cérebro. Nos casos mais bem estudados, a dessensibilização inclui a fosforilação do receptor e a ligação de uma proteína (arrestina) que interrompe as interações entre receptor e proteína G. VR é o receptor de vasopressina; β-AR é o receptor β-adrenérgico. Abreviações para outros receptores e proteínas G estão conforme ilustrações anteriores.

ativadoras de GTPase (GAP) ou proteínas RGS (reguladores da sinalização por proteínas G; ver Figura 12-5 e Figura Q-4 do Quadro 12-2). Em alguns casos, as enzimas efetoras que são os alvos da modulação pelas proteínas G também atuam como GAP. O mecanismo de dessensibilização que envolve a fosforilação da região carboxiterminal seguida pela ligação da arrestina é amplamente distribuído, e pode ser universal.

### RESUMO 12.10 Transdução sensorial na visão, no olfato e no paladar

- Visão, olfato e paladar em vertebrados fazem uso de GPCR, que agem por meio de proteínas G heterotriméricas para alterar o $V_m$ de neurônios sensoriais.
- Nos bastonetes e cones da retina, a luz ativa a rodopsina, a qual ativa a proteína G transducina. A subunidade $\alpha$ liberada da transducina ativa uma fosfodiesterase de cGMP, que diminui a [cGMP] e, desta maneira, fecha canais iônicos dependentes de cGMP no segmento externo do neurônio. A resultante hiperpolarização do bastonete ou cone conduz o sinal para o próximo neurônio da rota, e, ao final, para o cérebro.
- Nos neurônios olfativos, o estímulo, que age por meio de GPCR e proteínas G, provoca um aumento na [cAMP] (pela ativação da adenilil-ciclase) ou um aumento na [$Ca^{2+}$] (pela ativação da PLC). Esses segundos mensageiros afetam canais iônicos e, portanto, $V_m$.
- Os neurônios gustativos têm GPCR que respondem a moléculas de sabor por meio da alteração nos níveis de cAMP, que altera $V_m$ por meio do controle de canais iônicos.
- Existe um alto grau de conservação das proteínas de sinalização e dos mecanismos de transdução entre os sistemas de sinalização e entre as espécies.

## 12.11 Regulação do ciclo celular por proteínas-cinases

Uma das manifestações mais evidentes das rotas de sinalização é a regulação do ciclo celular eucariótico. Durante o crescimento embrionário e o desenvolvimento posterior, a divisão celular acontece em praticamente todos os tecidos. Nos organismos adultos, a maioria dos tecidos torna-se quiescente. A "decisão" de uma célula de dividir-se ou não é de grande importância para o organismo. Quando os mecanismos de regulação que limitam a divisão celular estão defeituosos e as células dividem-se desordenadamente, o resultado é catastrófico – câncer. A divisão celular correta requer uma sequência organizada de eventos bioquímicos que asseguram a cada célula-filha um conjunto completo das moléculas necessárias para a vida. As investigações sobre o controle da divisão celular em diversas células eucarióticas têm revelado mecanismos de regulação universais. Os mecanismos de sinalização, muito semelhantes àqueles discutidos anteriormente, são fundamentais para determinar se e quando uma célula passa pela divisão celular, garantindo também a passagem ordenada pelos estágios do ciclo celular.

### O ciclo celular tem quatro estágios

A divisão celular que segue a mitose em eucariotos ocorre em quatro etapas bem definidas (**Figura 12-44**). Na fase S (síntese), o DNA é replicado para gerar as cópias para ambas as células-filhas. Na fase G2 (G indica o intervalo entre divisões; do inglês *gap*), novas proteínas são sintetizadas e a célula praticamente dobra de tamanho. Na fase M (mitose), o envelope nuclear materno se desfaz, os cromossomos pareados são puxados para os polos opostos da célula, cada conjunto de cromossomos é circundado por um envelope nuclear recém-formado, e a citocinese divide a célula pela metade, originando duas células-filhas (ver Figura 24-24). Nos tecidos embrionários ou naqueles de proliferação rápida, cada célula-filha se divide novamente, mas somente após um período de espera (G1). Nas células animais em cultura, o processo completo consome cerca de 24 horas.

Depois de passar pela mitose e entrar em G1, a célula entra em outro ciclo de divisão, ou para de se dividir, entrando em uma fase quiescente (G0) que pode durar horas, dias ou todo o período de vida da célula. Quando uma célula em G0 começa a dividir-se novamente, ela reentra no ciclo de divisão pela fase G1. As células diferenciadas, como hepatócitos ou adipócitos, adquiriram forma e função especializadas; elas permanecem na fase G0. As células-tronco retêm o potencial de divisão e diferenciação em qualquer um de vários tipos celulares.

### Os níveis de proteínas-cinases dependentes de ciclina oscilam

A sincronia do ciclo celular é controlada por uma família de proteínas-cinases cujas atividades variam em resposta a si-

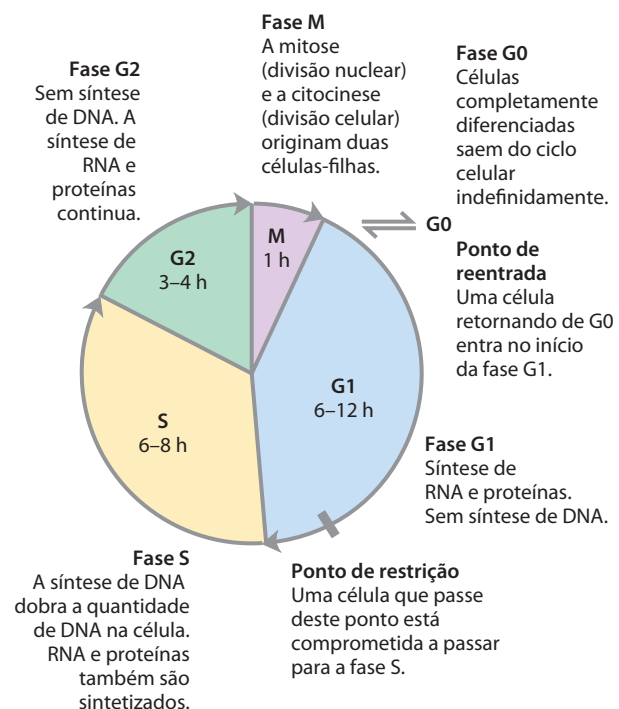



**FIGURA 12-44 O ciclo celular eucariótico.** As durações (em horas) dos quatro estágios variam, porém as apresentadas aqui são típicas.

nais celulares. Por meio da fosforilação de proteínas específicas em intervalos de tempo precisamente cronometrados, estas proteínas-cinases coordenam as atividades metabólicas da célula para efetuar a divisão celular ordenada. As cinases são heterodímeros com uma subunidade de regulação, a **ciclina**, e uma subunidade catalítica, a **proteína-cinase dependente de ciclina** (**CDK**, de *cyclin-dependent protein kinase*). Na ausência da ciclina, a subunidade catalítica é praticamente inativa. Quando a ciclina se liga, o sítio catalítico se abre, um resíduo essencial para a catálise torna-se acessível (**Figura 12-45**), e a atividade cinásica da subunidade catalítica aumenta 10.000 vezes. As células animais têm pelo menos 10 ciclinas diferentes (designadas A, B, e assim por diante) e pelo menos 8 CDK (de CDK1 a CDK8), que trabalham em diferentes combinações em pontos específicos do ciclo celular. As plantas também utilizam uma família de CDK para regular a divisão celular nas raízes e meristemas dos brotos, os principais tecidos nos quais ocorre divisão.

Em uma população de células animais dividindo-se sincronizadamente, as atividades de algumas CDK apresentam marcadas oscilações (**Figura 12-46**). Essas oscilações são o resultado de quatro mecanismos de regulação das atividades das CDK: fosforilação ou desfosforilação da CDK, degradação controlada da subunidade ciclina, síntese periódica de CDK e ciclinas, e a ação das proteínas inibidoras específicas de CDK. A ativação e a inativação precisamente cronometradas de uma série de CDK produzem os sinais que agem como o relógio-mestre que orquestra os eventos da divisão celular normal e garante que um estágio seja completado antes que o próximo inicie.

**Regulação das CDK por fosforilação.** A atividade de uma CDK é notavelmente afetada pela fosforilação e desfosforilação de dois resíduos críticos da proteína (**Figura 12-47a**). A fosforilação da Ⓟ-$Tyr^{15}$ próxima à extremidade aminoterminal torna a CDK2 inativa; o resíduo de Ⓟ-Tyr está no sítio de ligação ao ATP da cinase, e o grupo fosfato, negativamente carregado, bloqueia a entrada do ATP. Uma fosfatase específica (uma PTPase) desfosforila este resíduo de Ⓟ-Tyr, permitindo a ligação do ATP. A fosforilação da $Thr^{160}$ na "alça T" da CDK, catalisada por outra proteína-cinase, força a saída da alça T da fenda de ligação do substrato, permitindo a ligação de uma proteína-alvo específica a jusante e a sua fosforilação pela CDK (ver Figura 12-45c).

**FIGURA 12-45 Ativação das proteínas-cinases dependentes de ciclinas (CDK) pelas ciclinas e por fosforilação.** As CDK, uma família de enzimas relacionadas, estão ativas somente quando associadas com as ciclinas, outra família de proteínas. A estrutura do cristal de CDK2 com e sem a ciclina revela as bases desta ativação. **(a)** Sem a ciclina (PDB ID 1HCK), a CDK2 dobra-se de maneira que um segmento, a alça T, obstrui o sítio de ligação para os substratos proteicos e, assim, inibe a atividade cinásica da proteína. O sítio de ligação para o ATP também é próximo à alça T. **(b)** Quando a ciclina se liga (PDB ID 1FIN), ela força alterações conformacionais que afastam a alça T do sítio ativo e reorienta uma hélice aminoterminal, trazendo um resíduo crucial para a catálise ($Glu^{51}$) para dentro do sítio ativo. **(c)** A fosforilação de um resíduo de Thr na alça T produz um resíduo negativamente carregado estabilizado pela interação com três resíduos de Arg, mantendo a CDK na conformação ativa (PDB ID 1JST).

**FIGURA 12-46 As variações nas atividades das CDK específicas durante o ciclo celular em animais.** A atividade da ciclina E-CDK2 tem um pico próximo ao limite entre as fases G1 e S, quando a enzima ativa desencadeia a síntese das enzimas necessárias para a síntese de DNA (ver Figura 12-49). A atividade da ciclina A-CDK2 aumenta durante as fases S e G2, e então diminui repentinamente na fase M, quando a ciclina B-CDK1 apresenta um pico.

A presença de quebras de fita simples de DNA causa a parada do ciclo celular em G2 pela regulação de uma CDK específica. Uma proteína-cinase específica (chamada de Rad3 em levedura), ativada pelas quebras de fita simples, inicia uma cascata que leva à inativação da PTPase que desfosforila a $Tyr^{15}$ da CDK. A CDK permanece inativa e a célula permanece parada em G2, incapaz de dividir-se até que o DNA seja reparado e os efeitos da cascata sejam revertidos.

**A degradação controlada das ciclinas.** A proteólise altamente específica e precisamente cronometrada das ciclinas mitóticas regula a atividade das CDK durante todo o ciclo celular. A progressão pela mitose requer primeiramente a ativação, e então a destruição, das ciclinas A e B, que ativam a subunidade catalítica da CDK da fase M. Essas ciclinas apresentam, próximo à extremidade aminoterminal, a sequência -Arg-Thr-Ala-Leu-Gly-Asp-Ile-Gly-Asn-, a "caixa de destruição", que as marca para a degradação. (O uso de "caixa" remete à prática comum, na diagramação de se-

(a)

❶ A ciclina não está presente; a CDK está inativa.

❷ A síntese de ciclina causa seu acúmulo.

❸ O complexo ciclina-CDK forma-se, mas a fosforilação da $Tyr^{15}$ bloqueia o sítio de ligação do ATP; ainda inativo.

❹ A fosforilação da $Thr^{160}$ na alça T e a remoção do grupo fosfato da $Tyr^{15}$ ativa o complexo ciclina-CDK muitas vezes.

❺ A CDK fosforila uma fosfatase, que ativa mais moléculas de CDK.

Ciclina
CDK
P
Tyr
Thr
Fosfatase
$P_i$

(b)

❻ A CDK fosforila a DBRP, ativando-a.

❼ A DBRP estimula a adição de moléculas de ubiquitina à ciclina pela ubiquitina-ligase.

❽ A ciclina é degradada pelo proteassomo, levando à inativação da CDK.

DBRP
U

**FIGURA 12-47 Regulação das CDK por fosforilação e proteólise. (a)** A proteína-cinase dependente de ciclina ativada no momento da mitose (a CDK da fase M) possui uma "alça T" que pode dobrar-se para dentro do sítio de ligação ao substrato. Quando a $Thr^{160}$ da alça T está fosforilada, a alça move-se para fora do sítio de ligação do substrato, ativando a CDK muitas vezes (etapa ❹). **(b)** O complexo ciclina-CDK ativo inicia sua própria inativação pela fosforilação da DBRP (proteína de reconhecimento de caixas de destruição; etapa ❻). A DBRP e a ubiquitina-ligase, então, unem diversas moléculas de ubiquitina (U) à ciclina (etapa ❼), marcando-a para a destruição pelos proteassomos, complexos enzimáticos proteolíticos (etapa ❽).

quências de ácidos nucleicos ou proteínas, de representar uma curta sequência com função específica em uma caixa. Isso não implica nenhuma estrutura tridimensional.) A proteína DBRP (proteína de reconhecimento de caixas de destruição; de *destruction box recognizing protein*) reconhece essa sequência e inicia o processo de degradação da ciclina aproximando a ciclina de outra proteína, a **ubiquitina**. A ciclina e a ubiquitina ativada são covalentemente unidas pela enzima ubiquitina-ligase (Figura 12-47b). Mais algumas moléculas de ubiquitina são assim anexadas, fornecendo o sinal para um complexo enzimático proteolítico, ou **proteassomo**, degradar a ciclina.

O que controla o momento correto para a degradação da ciclina? Uma alça de retroalimentação ocorre dentro do processo geral mostrado na Figura 12-47. A elevada atividade da CDK (etapa ❹) culmina na proteólise da ciclina (etapa ❽). A ciclina recém-sintetizada se associa e ativa a CDK, que fosforila e ativa a DBRP. A DBRP ativa, então, leva à proteólise da ciclina. O decréscimo no nível de ciclina causa um declínio na atividade da CDK, e a atividade da DBRP também é reduzida, por desfosforilação e inativação lentas e constantes, com a ajuda de uma DBRP-fosfatase. O nível de ciclina é, ao final, restaurado pela síntese de novas moléculas de ciclina.

A função da ubiquitina e dos proteassomos não se limita à regulação das ciclinas; como será visto no Capítulo 27, também envolve a renovação das proteínas celulares, processo fundamental para a manutenção celular.

**A síntese regulada de CDK e ciclinas** O terceiro mecanismo para a alteração da atividade das CDK é a regulação da taxa de síntese de ciclinas ou CDK, ou de ambas. Por exemplo, ciclina D, ciclina E, CDK2 e CDK4 são sintetizadas apenas quando um fator de transcrição específico, E2F, está presente no núcleo para ativar a transcrição destes genes. A síntese de E2F é, por sua vez, regulada por sinais extracelulares como **fatores de crescimento** e citocinas (sinais de desenvolvimento que induzem a divisão celular), compostos identificados como essenciais para a divisão das células de mamíferos em cultura. Eles induzem a síntese de fatores de transcrição nucleares específicos e essenciais para a expressão das enzimas de síntese do DNA. Os fatores de crescimento induzem a fosforilação das proteínas nucleares Jun e Fos, fatores de transcrição que promovem a síntese de uma grande variedade de produtos gênicos, incluindo ciclinas, CDK e E2F. Por sua vez, E2F controla a expressão de diversas enzimas essenciais para a síntese de desoxinucleotídeos e DNA, possibilitando que as células entrem na fase S (**Figura 12-48**).

**Inibição das CDK** Finalmente, inibidores proteicos específicos se ligam e inativam CDK específicas. Uma dessas proteínas é a p21, discutida a seguir.

Esses quatro mecanismos de controle modulam a atividade de CDK específicas, as quais, por sua vez, controlam se a célula irá se dividir, diferenciar, se tornar quiescente permanentemente ou começar um novo ciclo de divisão após um período de quiescência. Os detalhes da regulação do ciclo celular, como o número de diferentes ciclinas e cinases, e as combinações nas quais elas agem, diferem de espécie para espécie, porém o mecanismo básico tem sido conservado na evolução de todas as células eucarióticas.

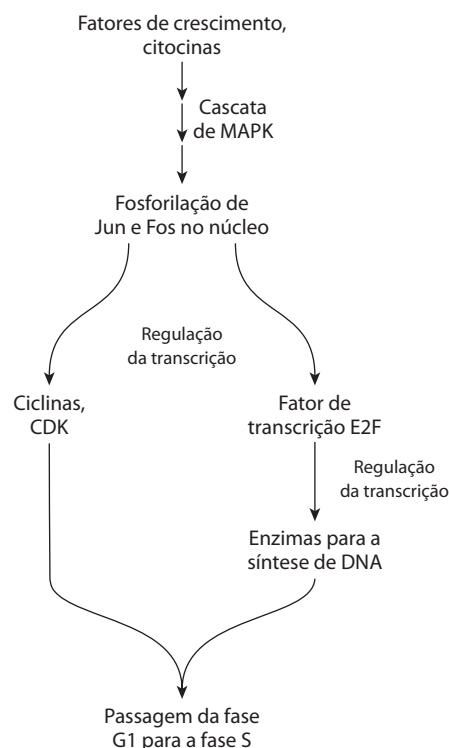



**FIGURA 12-48 Regulação da divisão celular por fatores de crescimento.** A rota entre os fatores de crescimento e a divisão celular passa pela cascata enzimática que ativa MAPK; a fosforilação dos fatores de transcrição nucleares Jun e Fos; e a atividade do fator de transcrição E2F, que promove a síntese de algumas enzimas essenciais à síntese de DNA.

## As CDK regulam a divisão celular pela fosforilação de proteínas cruciais

Foi examinado como as células mantêm um rigoroso controle da atividade das CDK, mas como a atividade das CDK controla o ciclo celular? A lista de proteínas-alvo reguladas pelas CDK continua a crescer, e muitas ainda estão para serem descobertas. É possível, porém, observar um padrão geral por trás da regulação pelas CDK pelo exame do efeito das CDK sobre a estrutura da lamina e da miosina, e também sobre a atividade da proteína do retinoblastoma.

A estrutura do envelope nuclear é mantida em parte por redes altamente organizadas de filamentos intermediários, compostos pela proteína lamina. O desmantelamento do envelope nuclear antes da segregação das cromátides-irmãs na mitose é parcialmente devido à fosforilação da lamina por uma CDK, que causa a despolimerização dos filamentos de lamina.

Um segundo alvo da cinase é a maquinaria contrátil impelida por ATP (actina e miosina) que separa uma célula em divisão em duas partes iguais durante a citocinese. Após a divisão, a CDK fosforila uma pequena subunidade de regulação da miosina, causando a dissociação da miosina dos filamentos de actina e inativando a maqui-

naria contrátil. A posterior desfosforilação possibilita a remontagem do aparato contrátil para a próxima rodada de citocinese.

Um terceiro substrato da CDK muito importante é a **proteína do retinoblastoma**, **pRb**; quando é detectado dano no DNA, essa proteína participa de um mecanismo que cessa a divisão celular em G1 (**Figura 12-49**). Nomeada em função da linhagem celular tumoral em que foi descoberta, a pRb atua na maioria dos tipos celulares, talvez em todos, para regular a divisão celular em resposta a uma grande variedade de estímulos. A pRb não fosforilada se liga ao fator de transcrição E2F; enquanto ligado a pRb, o E2F não consegue estimular a transcrição de um grupo de genes necessários para a síntese de DNA (os genes da DNA-polimerase $\alpha$, da ribonucleotídeo-redutase e de outras proteínas; ver Capítulo 25). Nesse estágio, o ciclo celular não pode progredir da fase G1 para a fase S, a fase que compromete a célula com a mitose e a divisão celular. O mecanismo de bloqueio pRb-E2F é interrompido quando pRb é fosforilada pela ciclina E-CDK2, o que ocorre em resposta a um sinal para o avanço da divisão celular.

**FIGURA 12-49 Regulação da passagem de G1 a S pela fosforilação de pRb.** O fator de transcrição E2F promove a transcrição dos genes de certas enzimas essenciais para a síntese do DNA. A proteína do retinoblastoma, pRb, pode ligar-se a E2F (embaixo à esquerda), inativando-o e impedindo a transcrição destes genes. A fosforilação da pRb pela CDK2 impede-a de ligar-se e inativar E2F, e os genes são transcritos, possibilitando a divisão celular. O dano ao DNA da célula (em cima à esquerda) provoca uma série de eventos que inativam a CDK2, bloqueando a divisão celular. Quando a proteína MRN detecta dano no DNA, ela ativa duas proteínas-cinases, ATM e ATR, e elas fosforilam e ativam o fator de transcrição, a proteína p53. A p53 ativa promove a síntese de outra proteína, p21, um inibidor de CDK2. A inibição da CDK2 interrompe a fosforilação de pRb, que, portanto, continua a ligar-se e inibir E2F. Com E2F inativado, os genes essenciais para a divisão celular não são transcritos e a divisão celular é bloqueada. Quando o DNA estiver reparado, esta inibição é liberada, e a célula divide-se.

Quando as proteínas-cinases ATM e ATR detectam dano no DNA (sinalizado pela presença da proteína MRN em um local com quebra na fita dupla), elas fosforilam p53, ativando-a para atuar como um fator de transcrição que estimula a síntese da proteína p21 (Figura 12-49). Essa proteína inibe a atividade cinásica da ciclina E-CDK2. Na presença de p21, a pRb permanece não fosforilada e ligada a E2F, bloqueando a atividade desse fator de transcrição, e a célula fica parada em G1. Isso garante à célula tempo para reparar o DNA antes de entrar na fase S, evitando a potencialmente desastrosa transferência de um genoma defeituoso a uma ou ambas as células-filhas. Quando o dano é sério demais para permitir o reparo eficaz, essa mesma maquinaria inicia um processo (apoptose, descrita a seguir) que leva à morte da célula, prevenindo o possível desenvolvimento de um câncer.

### RESUMO 12.11 Regulação do ciclo celular por proteínas-cinases

- A progressão durante o ciclo celular é regulada pelas proteínas-cinases dependentes de ciclina (CDK), que agem em pontos específicos do ciclo, fosforilando proteínas-chave e modulando suas atividades. A subunidade catalítica das CDK permanece inativa quando não associada com a subunidade de regulação ciclina.
- A atividade de um complexo ciclina-CDK varia durante o ciclo celular pela síntese diferenciada das CDK, degradação específica de ciclinas, fosforilação e desfosforilação de resíduos críticos nas CDK, e ligação de inibidores proteicos a complexos ciclina-CDK específicos.
- Entre os alvos fosforilados pelas ciclina-CDK estão proteínas do envelope nuclear e proteínas necessárias para a citocinese e o reparo do DNA.

## 12.12 Oncogenes, genes supressores tumorais e morte celular programada

Tumores e cânceres são o resultado da divisão celular descontrolada. Normalmente, a divisão celular é regulada por uma família de fatores de crescimento extracelulares, proteínas que levam células em repouso a dividirem-se e, em alguns casos, diferenciarem-se. O resultado é um equilíbrio entre a formação de novas células (como as células da pele, que morrem e são repostas em um ciclo de poucas semanas, ou os leucócitos, repostos em um ciclo de poucos dias) e a destruição celular. Quando esse equilíbrio é perturbado por defeitos nas proteínas de regulação, o resultado algumas vezes é a formação de um clone celular que se divide repetidamente e sem regulação (um tumor) até que sua presença interfira com o funcionamento dos

tecidos normais – um câncer. A causa direta é quase sempre um defeito genético em uma ou mais das proteínas que regulam a divisão celular. Em alguns casos, um gene defeituoso é herdado de um dos pais; em outros casos, a mutação ocorre quando um composto tóxico do meio ambiente (composto mutagênico ou carcinogênico) ou mesmo a radiação de alta energia interage com o DNA de uma única célula, danifica-o e introduz uma mutação. Na maioria dos casos, existem ambas as contribuições, hereditária e ambiental, e mais de uma mutação é necessária para causar a completa desregulação da divisão e o desenvolvimento de câncer.

## Os oncogenes são formas mutantes dos genes de proteínas que regulam o ciclo celular

Os **oncogenes** foram originalmente descritos em vírus causadores de tumor, sendo posteriormente descoberto que eram derivados de genes das células hospedeiras animais, os **proto-oncogenes**, que codificam proteínas reguladoras do crescimento. Durante uma infecção viral, a sequência de DNA de um proto-oncogene do hospedeiro é, algumas vezes, copiada para dentro do genoma viral, onde ela prolifera juntamente com o vírus. Nos ciclos de infecção seguintes, os proto-oncogenes podem se tornar defeituosos por mutações ou deleções. Os vírus, diferentemente das células animais, não têm mecanismos efetivos para a correção de erros durante a replicação do DNA, de modo que acumulam mutações rapidamente. Quando um vírus portando um oncogene infecta uma nova célula hospedeira, o DNA viral (e o oncogene) pode ser incorporado ao DNA da célula hospedeira, na qual ele pode agora interferir na regulação da divisão celular. Em um mecanismo alternativo, não viral, uma única célula em um tecido exposto a compostos carcinogênicos pode sofrer um dano ao DNA que torne uma de suas proteínas reguladoras defeituosa, com o mesmo efeito do mecanismo oncogênico: falhas na regulação da divisão celular.

As mutações que originam oncogenes são geneticamente dominantes; se um cromossomo de um par contiver um gene defeituoso, o produto daquele gene enviará o sinal "divida-se", o que poderá resultar em um tumor. O defeito oncogênico pode estar em qualquer uma das proteínas envolvidas na comunicação do sinal "divida-se". Os oncogenes descobertos até este momento incluem aqueles que codificam proteínas secretórias, fatores de crescimento, proteínas transmembrana (receptores), proteínas citoplasmáticas (proteínas G e proteínas-cinases) e os fatores de transcrição nucleares que controlam a expressão dos genes essenciais para a divisão celular (Jun, Fos).

Alguns oncogenes codificam receptores de superfície com sítios de ligação ao sinal defeituosos ou ausentes, de maneira que sua atividade Tyr-cinásica intrínseca está desregulada. Por exemplo, a oncoproteína ErbB é essencialmente idêntica ao receptor normal do fator de crescimento da epiderme, exceto que ErbB carece do domínio aminoterminal que normalmente liga-se a EGF (**Figura 12-50**) e, consequentemente, transmite o sinal "divida-se" estando o EGF presente ou não. As mutações em *erbB2*, o gene de um receptor Tyr-cinase relacionado a ErbB, são comumente associadas com os cânceres do epitélio glandular em mama,

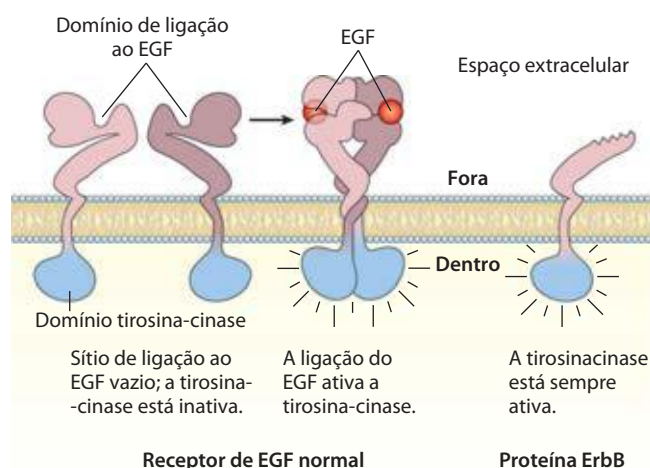



**FIGURA 12-50 Receptores defeituosos de EGF codificados por oncogenes.** O produto do oncogene *erbB* (a proteína ErbB) é uma versão truncada do receptor normal para o fator de crescimento da epiderme (EGF). O domínio intracelular apresenta a estrutura normalmente induzida pela ligação do EGF, porém a proteína carece do sítio extracelular de ligação a EGF. Não sendo regulada pelo EGF, a ErbB continuamente sinaliza a divisão celular.

estômago e ovário. (Consulte uma explicação sobre o uso de abreviações na denominação de genes e seus produtos no Capítulo 25.)

O importante papel desempenhado pelas proteínas-cinases nos processos de sinalização relacionados à divisão celular normal e anormal as coloca como um dos principais alvos no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de câncer (Quadro 12-5). Formas mutantes da proteína G Ras são comuns em células tumorais. O oncogene *ras* codifica uma proteína que normalmente se liga ao GTP, porém sem atividade GTPásica. A proteína Ras mutante está, portanto, sempre na forma ativada (ligada a GTP), independentemente dos sinais que cheguem por meio dos receptores normais. O resultado pode ser o crescimento desregulado. As mutações no *ras* estão associadas com 30 a 50% dos carcinomas de pulmão e colo, e com mais de 90% dos carcinomas pancreáticos. ■

## Os defeitos em determinados genes eliminam a repressão normal da divisão celular

Os **genes supressores tumorais** codificam proteínas que normalmente reprimem a divisão celular. As mutações em um ou mais desses genes pode levar à formação de tumores. O crescimento desregulado devido a genes supressores tumorais defeituosos, ao contrário do que ocorre com os oncogenes, é geneticamente recessivo; os tumores se formam somente se *ambos* os cromossomos de um par contiverem o gene defeituoso. Isso ocorre porque a função desses genes é impedir a divisão celular, e se uma das cópias do gene para uma de tais proteínas estiver normal, a inibição normal da divisão ocorre. Em uma pessoa que herda uma cópia correta e uma cópia defeituosa, todas as células têm uma cópia defeituosa do gene. Se qualquer uma das $10^{12}$ células somáticas sofrer uma mutação na cópia correta, um tumor pode crescer a partir dessa célula duplamente mutada. As mutações nas duas cópias dos genes de pRb,

## QUADRO 12-5  MEDICINA O desenvolvimento de inibidores de proteínas-cinases para o tratamento de câncer

Quando uma única célula se divide sem qualquer limitação regulatória, ela originará, no final, um clone de células tão grande que ele interferirá com as funções fisiológicas normais (Figura Q-1). Isso é câncer, uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos e em expansão nos países em desenvolvimento. Em todos os tipos de câncer, a regulação normal da divisão celular torna-se disfuncional devido aos defeitos em um ou mais genes. Por exemplo, os genes que codificam proteínas que normalmente emitem sinais intermitentes para a divisão celular tornam-se oncogenes, originando proteínas sinalizadoras constitutivamente ativas; ou os genes que codificam proteínas que normalmente reprimem a divisão celular (genes supressores tumorais) são mutados e acabam originando proteínas que carecem dessa função de controle. Em muitos tumores, ambos os tipos de mutações ocorrem.

Muitos oncogenes e genes supressores tumorais codificam proteínas-cinases ou proteínas que atuam nas rotas de sinalização em posições a jusante às proteínas-cinases. É, portanto, lógico imaginar que inibidores específicos de proteínas-cinases mostrar-se-iam úteis para o tratamento de câncer. Por exemplo, uma forma mutante do receptor de EGF é um receptor Tyr-cinase (RTK) constantemente ativo, sinalizando a divisão celular caso o EGF esteja presente ou não (ver Figura 12-50). Em cerca de 30% das mulheres com câncer de mama invasivo, uma mutação no gene do receptor HER2/neu origina um RTK com a atividade aumentada em até 100 vezes. Outro RTK, o **receptor do fator de crescimento endotelial vascular** (**VEGFR**, de *vascular endothelial growth factor receptor*), deve ser ativado para que a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) forneça a um tumor sólido seu próprio suprimento de sangue, e a inibição do VEGFR pode privar um tumor de nutrientes essenciais. As Tyr-cinases que não participam de receptores também podem ser mutadas, resultando em constante sinalização e divisão celular desregulada. Por exemplo, o oncogene *Abl* (do vírus da leucemia de Abelson; de *Abelson leukemia virus*) é associado à leucemia mieloide aguda, uma doença sanguínea relativamente rara (~5.000 casos por ano nos Estados Unidos). Outro grupo de oncogenes codifica proteínas-cinases dependentes de ciclina desreguladas. Em cada um desses casos, inibidores específicos de proteínas-cinases poderiam ser valiosos agentes quimioterápicos para o tratamento da doença. Não surpreendentemente, esforços enormes para o desenvolvimento desses inibidores estão sendo feitos. Como abordar esse desafio?

As proteínas-cinases de todos os tipos apresentam uma notável conservação da estrutura do sítio ativo. Todas compartilham as características da estrutura prototípica da PKA mostradas na Figura Q-2: dois lobos que circundam o sítio ativo, com uma alça P que auxilia no alinhamento e na ligação dos grupos fosfato do ATP, uma alça de ativação que se move para a abertura do sítio ativo ao substrato proteico, e uma hélice C que muda de posição quando a enzima é ativada, trazendo os resíduos da fenda de ligação ao substrato até suas posições de ligação.

Os inibidores de proteínas-cinases mais simples são os análogos de ATP, que ocupam o sítio de ligação do ATP, mas não servem como doadores de grupos fosfato. Muitos desses compostos são conhecidos, porém sua utilidade clínica é limitada pela falta de seletividade – inibem praticamente todas as proteínas-cinases e provocariam efeitos colaterais intoleráveis.

**FIGURA Q-1** A divisão desregulada de uma única célula do colo levou a um câncer primário que metastatizou para o fígado. Os cânceres secundários são visualizados como manchas brancas neste fígado obtido em uma necropsia.

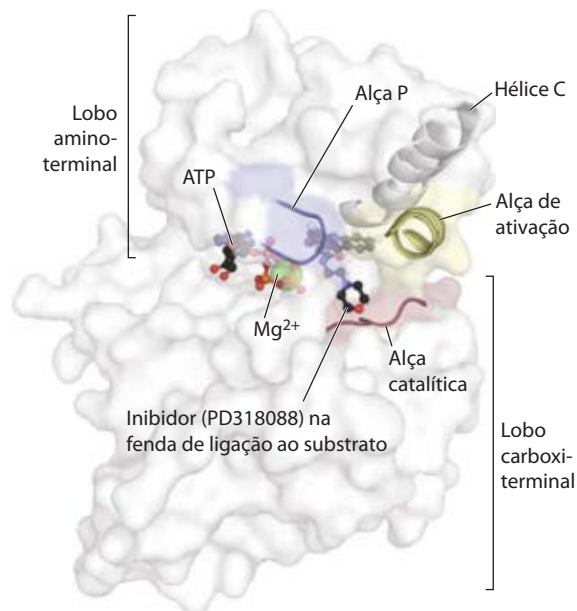



**FIGURA Q-2** As características conservadas do sítio ativo das proteínas-cinases (PDB ID 1S91). Os lobos aminoterminal e carboxiterminal circundam o sítio ativo da enzima, próximos à alça catalítica e ao sítio onde o ATP se liga. A alça de ativação desta e de muitas outras cinases é fosforilada e, então, afasta-se do sítio ativo para expor a fenda de ligação ao substrato, a qual, nesta imagem, está ocupada por um inibidor específico desta enzima, PD318088. A alça P é essencial para a ligação do ATP, e a hélice C também deve estar corretamente alinhada para a ligação do ATP e a atividade cinásica.

Maior seletividade é encontrada nos compostos que ocupam parte do sítio de ligação do ATP, porém interagem também fora desse sítio, com regiões da proteína exclusivas da proteína-cinase-alvo. Uma terceira estratégia possível tem como base o fato de que, embora as conformações ativas de todas as proteínas-cinases sejam semelhantes, suas conformações inativas não o são. Os fármacos direcionados à conformação inativa de uma proteína-cinase específica impedem sua conversão à forma ativa e apresentam maior especificidade de ação. Uma quarta abordagem utiliza a grande especificidade dos anticorpos. Por exemplo, anticorpos monoclonais (p. 178) que se ligam às porções extracelulares de RTK específicos poderiam eliminar a atividade cinásica do receptor por impedirem a dimerização ou por causarem sua remoção da superfície celular. Em alguns casos, um anticorpo seletivamente ligado à superfície de células cancerosas poderia estimular o sistema imune a atacar aquelas células.

A pesquisa por fármacos ativos contra proteínas-cinases específicas tem produzido resultados encorajadores. Por exemplo, o mesilato de imatinibe (Glivec; Figura Q-3a), uma das pequenas moléculas inibidoras, tem se mostrado praticamente 100% eficaz em causar a regressão em pacientes nos estágios iniciais de leucemia mieloide crônica. O erlotinibe (Tarceva; Figura Q-3b), direcionado ao EGFR, é efetivo no tratamento de câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC, de *non-small-cell lung cancer*) avançado. Como muitos sistemas de sinalização para a divisão celular envolvem mais de uma proteína-cinase, os inibidores que agem sobre diferentes proteínas-cinases podem ser úteis para o tratamento de câncer. O sunitinibe (Sutent) e o sorafenibe (Nexavar) têm diversas proteínas-cinases como alvos, incluindo VEGFR e PDGFR. Esses dois fármacos estão em uso clínico em pacientes com tumores estromais gastrintestinais e adenocarcinoma renal avançado, respectivamente. O trastuzumabe (Herceptin), o cetuximabe (Erbitux) e o bevacizumabe (Avastin) são anticorpos monoclonais direcionados a HER2/neu, EGFR e VEGFR, respectivamente; os três fármacos estão em uso clínico para determinados tipos de câncer. O conhecimento detalhado da estrutura ao redor do sítio de ligação do ATP torna possível o desenho de fármacos que inibam uma proteína-cinase *específica* por (1) bloquear o sítio de ligação do ATP crítico, enquanto (2) interagem com resíduos ao redor desse sítio que sejam *únicos* para essa proteína-cinase em particular.

Pelo menos mais outros 100 compostos estão em fase pré-clínica. Entre os fármacos em fase de avaliação estão alguns obtidos a partir de fontes naturais e alguns produzidos por síntese química. A indirubina é um componente de um preparado de ervas chinês tradicionalmente utilizado para tratar certas leucemias; ela inibe CDK2 e CDK5. A roscovitina (Figura Q-3d), uma adenina substituída, tem um anel benzil que a torna altamente específica como um inibidor da CDK2. Com algumas centenas de potenciais fármacos anticâncer entrando na fase de testes clínicos, é realista imaginar que alguns se mostrarão mais efetivos ou mais específicos do que os fármacos atualmente em uso.

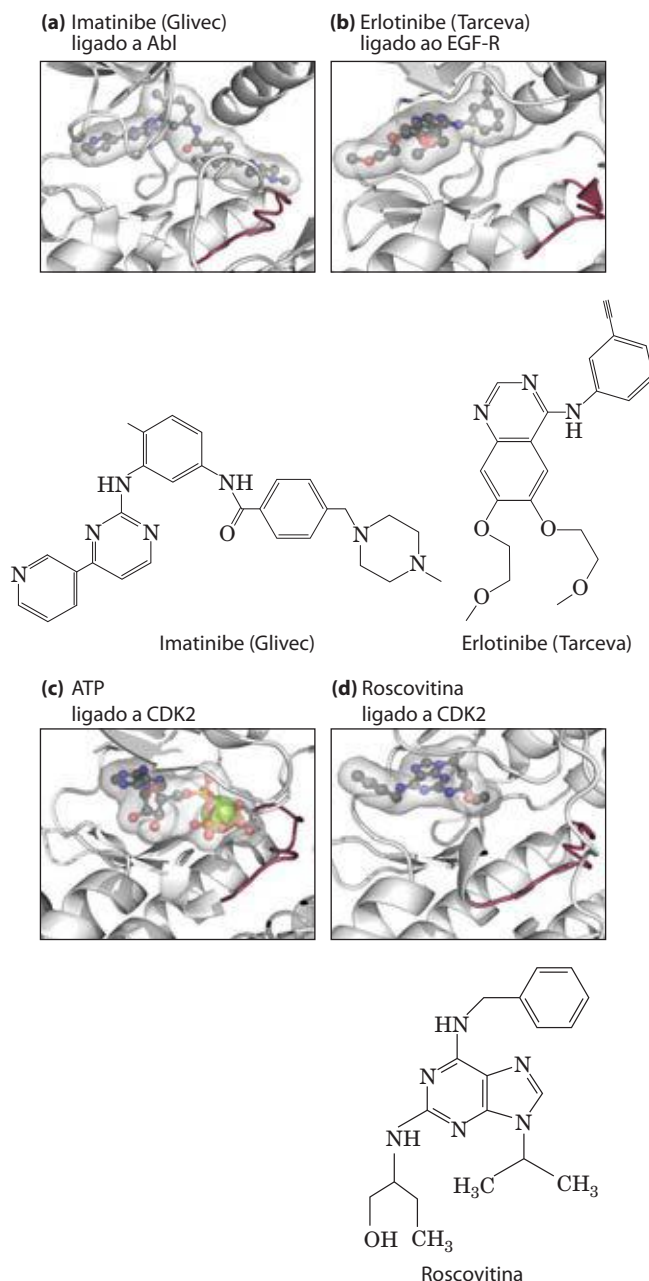



**FIGURA Q-3** Alguns inibidores de proteínas-cinases atualmente em testes clínicos ou em uso clínico, mostrando sua ligação à proteína-alvo. **(a)** O imatinibe se liga ao sítio ativo da cinase do oncogene Abl (PDB ID 1IEP); ele ocupa tanto o sítio de ligação ao ATP quanto uma região adjacente a este sítio. **(b)** O erlotinibe se liga ao sítio ativo do EGF-R (PDB ID 1M17). **(c), (d)** A roscovitina é um inibidor da cinase dependente de ciclina CDK2; está mostrada aqui a ligação normal Mg-ATP (c) no sítio ativo (PDB ID 1S9I) e a ligação da roscovitina (d), que impede a ligação do ATP (PDB ID 2A4L).

p53 ou p21 originam células nas quais a repressão normal da divisão celular é perdida e um tumor é formado.

O retinoblastoma ocorre em crianças e causa cegueira caso não tratado cirurgicamente. As células de um retinoblastoma têm duas formas defeituosas do gene *Rb* (dois alelos defeituosos). Crianças muito novas que desenvolvem retinoblastoma em geral apresentam múltiplos tumores em ambos os olhos. Essas crianças herdaram uma cópia defeituosa do gene *Rb*, que está presente em todas as células; cada tumor é derivado de uma única célula da retina que sofreu uma mutação em sua cópia correta do gene *Rb*. (Um feto com os dois alelos mutantes em todas as células não sobrevive.) As pessoas com retinoblastoma que sobrevivem à infância mais tarde também apresentam uma alta incidência de cânceres de pulmão, próstata e mama.

Um evento muito menos provável é que uma pessoa nascida com duas cópias corretas do gene *Rb* sofra mutações independentes em ambas as cópias na *mesma* célula. Alguns indivíduos de fato desenvolvem retinoblastomas mais tarde na infância, em geral apresentando um tumor em um dos olhos. Esses indivíduos presumivelmente nasceram com as duas cópias (alelos) corretas de *Rb* em todas as células, mas ambos os alelos *Rb* foram mutados em uma única célula da retina, levando a um tumor. Após a idade aproximada de três anos, as células da retina param de se dividir, e os retinoblastomas em idades mais avançadas são extremamente raros.

Genes de estabilidade (também chamados de genes de manutenção) codificam proteínas que atuam no reparo dos principais defeitos genéticos que resultam da replicação aberrante do DNA, da radiação ionizante ou de compostos carcinogênicos do ambiente. As mutações nesses genes levam a uma alta frequência de danos não reparados (mutações) em outros genes, incluindo proto-oncogenes e genes supressores tumorais, portanto, levando ao câncer. Entre os genes de estabilidade estão o *ATM* (ver Figura 12-49); a família de genes *XP*, na qual mutações levam ao xeroderma pigmentoso; e os genes *BRCA1*, associados a alguns tipos de câncer de mama (ver Quadro 25-1). As mutações no gene da p53 também causam tumores; em mais de 90% dos carcinomas cutâneos de células escamosas (cânceres de pele) e em aproximadamente 50% de todos os outros cânceres humanos, o *p53* está defeituoso. Os indivíduos extremamente raros, os quais *herdam* uma cópia defeituosa de *p53*, geralmente apresentam a síndrome de Li-Fraumeni, com múltiplos cânceres (de mama, cérebro, ossos, sangue, pulmão e pele) que surgem com alta frequência na infância. A explicação para os múltiplos tumores nesse caso é a mesma das mutações do gene *Rb*: um indivíduo nascido com uma cópia defeituosa do *p53* em todas as células somáticas tem a probabilidade de sofrer uma segunda mutação no *p53* em mais de uma célula durante a vida.

Em resumo, três classes de defeitos contribuem para o desenvolvimento de câncer: oncogenes, nos quais o defeito é o equivalente a um pedal acelerador de um carro sendo sempre pressionado, com o motor funcionando em velocidade total; genes supressores tumorais, nos quais o defeito causa o equivalente a uma falha nos freios; e genes de estabilidade mutados, com o defeito levando a danos não reparados na maquinaria de replicação celular, o equivalente a um mecânico destreinado.

As mutações em oncogenes e genes supressores tumorais não apresentam um efeito tudo ou nada. Em alguns cânceres, talvez em todos, a progressão de uma célula normal a um tumor maligno requer o acúmulo de mutações (algumas vezes ao longo de décadas), nenhuma das quais, por si só, é responsável pelo resultado final. Por exemplo, o desenvolvimento de câncer colorretal apresenta alguns estágios distintos, cada um associado a uma mutação (**Figura 12-51**). Se uma célula epitelial do colo sofrer uma mutação em ambas as cópias do gene supressor tumoral *APC* (polipose adenomatosa do colo; de *adenomatous polyposis coli*), ela começa a dividir-se mais rapidamente do que o normal e produz um clone dela mesma, um pólipo benigno (adenoma em estágio inicial). Por razões ainda desconhecidas, as mutações no *APC* resultam em instabilidade cromossômica, e regiões inteiras de um cromossomo são perdidas ou rearranjadas durante a divisão celular. Essa instabilidade pode levar a outra mutação, comumente no gene *ras*, que converte o clone em um adenoma em estágio intermediário. Uma terceira mutação (frequentemente no gene supressor tumoral *DCC*) leva a um adenoma em estágio avançado. Somente quando ambas as cópias do *p53* estiverem defeituosas, essa massa de células se tornará um carcinoma – um tumor maligno, com risco de morte. A sequência completa, portanto, requer pelo menos sete "ataques" genéticos: dois em cada um dos três genes supressores tumorais (*APC*, *DCC* e *p53*) e um no proto-oncogene *ras*. É plausível que existam também outras rotas para o câncer colorretal, mas o princípio de que a malignidade máxima resulta somente de múltiplas mutações provavelmente seja verdadeiro para todas elas. Quando um pólipo é detectado no estágio de adenoma inicial e as células contendo as primeiras mutações são cirurgicamente removidas, adenomas avançados e carcinomas não se desenvolverão; por esta razão, a importância da detecção precoce. As células e os organismos também têm seus sistemas de detecção precoce. Por exemplo, as proteínas ATM e ATR descritas na Seção 12.11 podem detectar danos no DNA extensos demais para serem reparados com sucesso. Essas proteínas iniciam, então, por uma rota que inclui a *p53*, o processo de apoptose, no qual uma célula que se tornou perigosa para o organismo mata a si mesma. ■

## A apoptose é o suicídio celular programado

Muitas células podem controlar precisamente o momento de sua própria morte pelo processo de **morte celular programada**, ou **apoptose** (do termo grego para "queda", como a queda das folhas no outono). Um estímulo para a apoptose são danos irreparáveis no DNA. A morte celular programada também ocorre durante o desenvolvimento embrionário, quando algumas células devem morrer para dar a um tecido ou órgão sua forma final. A modelagem dos dedos a partir do apêndice arredondado dos membros requer a morte precisamente cronometrada das células entre os ossos em desenvolvimento. Durante o desenvolvimento do nematódeo *C. elegans* a partir de um óvulo fecundado, exatamente 131 células (de um total de 1.090 células somáticas embrionárias) devem ser eliminadas por morte celular programada para que o corpo do adulto seja construído.

A apoptose também tem funções em outros processos que não o desenvolvimento. Se uma célula produtora de

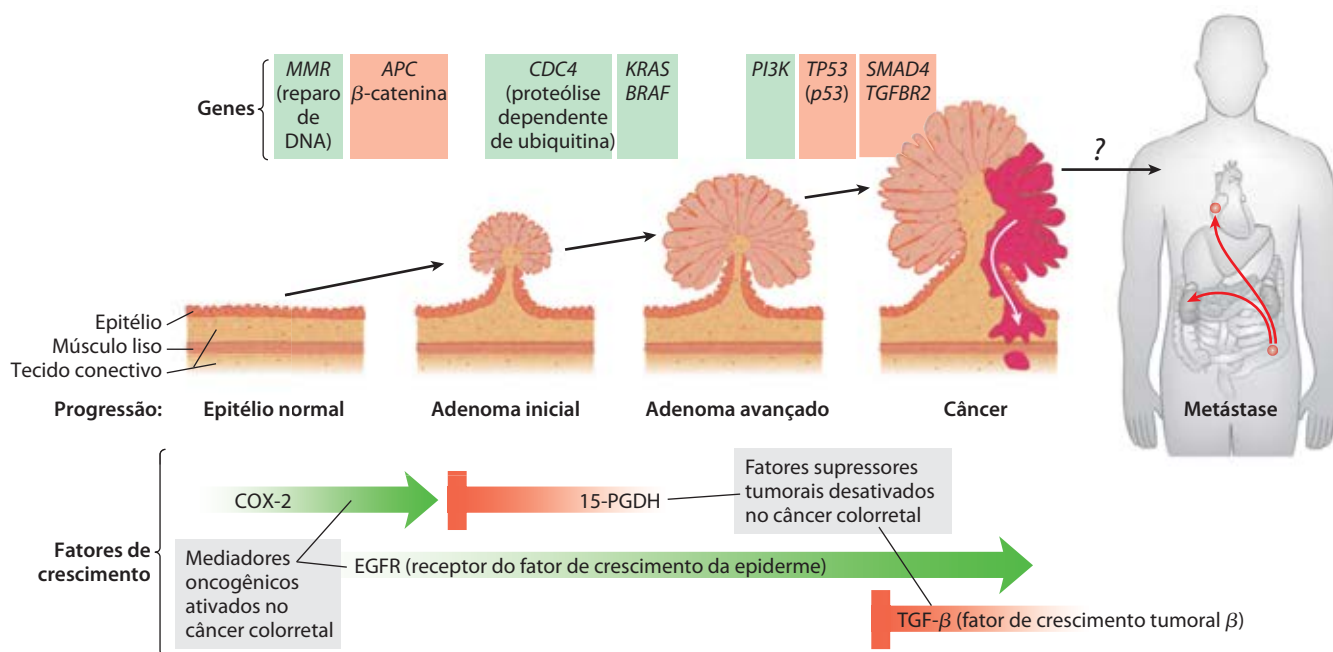



**FIGURA 12-51** **As múltiplas etapas da transição de uma célula epitelial normal a um câncer colorretal.** Uma série de mutações em oncogenes (em verde) ou em genes supressores tumorais (em vermelho) progressivamente levam à diminuição do controle da divisão celular, culminando com a formação de um tumor ativo, o qual pode, algumas vezes, formar metástases (espalhar-se do local inicial para outras regiões do corpo). A mutação do gene *MMR* causa defeitos no reparo do DNA e, consequentemente, uma maior taxa de mutações. Mutações em ambas as cópias do gene supressor tumoral *APC* levam à formação de agrupamentos de células epiteliais que se multiplicam muito rapidamente (adenoma em estágio inicial). O oncogene *CDC4* resulta em defeitos na ubiquitinação, que é essencial para a regulação das cinases dependentes de ciclina (ver Figura 12-47). Os oncogenes *KRAS* e *BRAF* codificam as proteínas ras e raf (ver Figura 12-15), e esta disfunção adicional da sinalização leva à formação de um adenoma avançado, que pode ser detectado por colonoscopia como um pólipo benigno. Mutações oncogênicas no gene *PI3K*, que codifica a enzima fosfoinositídeo-3-cinase, ou no gene *PTEN*, que regula a síntese desta enzima, reforçam ainda mais o sinal: divida-se agora. Quando uma célula em um dos pólipos sofrer outras mutações, por exemplo, nos genes supressores tumorais *DCC* e *p53* (ver, Figura 12-49), tumores progressivamente agressivos se formam. Finalmente, mutações em outros genes supressores tumorais, como *SMAD4*, levam a um tumor maligno e, algumas vezes, a um tumor metastático que pode disseminar-se para outros tecidos. Um segundo tipo de mutação, que afete a produção ou ação de fatores de crescimento ou seus receptores (abaixo), pode aumentar os efeitos deletérios. Mutações no EGFR (receptor do fator de crescimento da epiderme) ou no TGF-β (fator de crescimento tumoral β) favorecem o crescimento descontrolado, assim como o fazem mutações nas enzimas que produzem certas prostaglandinas (COX-2; ciclo-oxigenase; ver p. 845-846) ou na enzima 15-PGDH (15-hidroxiprostaglandina-desidrogenase). A maioria dos tumores malignos de outros tecidos provavelmente resulta de uma série de mutações como estas, embora não necessariamente nestes genes específicos, ou nesta mesma ordem.

anticorpos origina anticorpos contra uma proteína ou glicoproteína normalmente presente no organismo, aquela célula é submetida à morte celular programada no timo – mecanismo essencial para a eliminação de autoanticorpos (a causa de muitas doenças autoimunes). A descamação mensal da parede do útero (menstruação) é outro exemplo da mediação da morte celular normal por apoptose. A queda das folhas no outono é o resultado da apoptose de células específicas do caule. Algumas vezes o suicídio celular não é programado, mas ocorre em resposta a circunstâncias biológicas que ameaçam o resto do organismo. Por exemplo, uma célula infectada por vírus que morre antes de completar o ciclo de infecção viral restringe a disseminação do vírus para as células próximas. Alguns tipos de estresse, como calor, hiperosmolaridade, luz UV e radiação gama, também provocam o suicídio celular; presumivelmente, o organismo estará melhor se quaisquer células aberrantes, potencialmente mutadas, estiverem mortas.

Os mecanismos de regulação que iniciam a apoptose envolvem algumas das mesmas proteínas que regulam o ciclo celular. O sinal para o suicídio com frequência chega do exterior, por meio de um receptor da superfície celular. O fator de necrose tumoral (TNF, de *tumor necrosis factor*), produzido pelas células do sistema imune, interage com as células por meio de receptores específicos para TNF. Esses receptores têm sítios de ligação a TNF na superfície externa da membrana plasmática e um "domínio de morte" (~80 resíduos de aminoácidos) que transmitem o sinal autodestrutivo através da membrana até proteínas citosólicas como a TRADD (domínio de morte associado ao receptor de TNF, de *TNF receptor-associated death domain*) (**Figura 12-52**). Outro receptor, Fas, tem um domínio de morte semelhante, que permite sua interação com a proteína citosólica FADD (domínio de morte associado a Fas; de *Fas-associated death domain*), a qual ativa a protease citosólica caspase 8. Essa enzima pertence a uma família de proteases que estão envolvidas na apoptose; todas são sintetizadas como pró-enzimas inativas, todas têm um resíduo de Cys crítico no sítio ativo, e todas hidrolisam as proteínas-alvo no lado carboxiterminal de resíduos de Asp específicos (daí o nome caspase, para *Cys* e *Asp*).

Quando a caspase 8, uma caspase "iniciadora", é ativada por um sinal apoptótico transmitido pelo FADD, ela amplifica sua ativação pela clivagem de sua própria for-

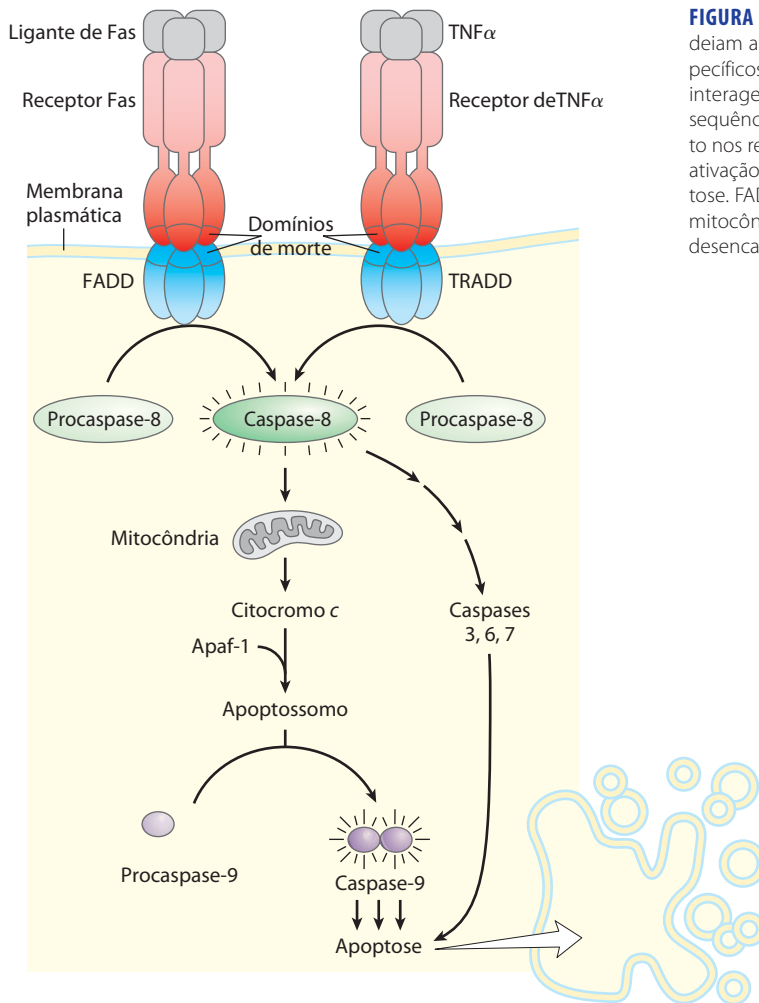



**FIGURA 12-52 Os eventos iniciais da apoptose.** Sinais que desencadeiam a apoptose de fora da célula (Fas e TNF$\alpha$) ligam-se a receptores específicos na membrana plasmática (FasR e TNF$\alpha$R). Os receptores ocupados interagem com as proteínas citosólicas FADD e TRADD por meio de uma sequência de 80 aminoácidos chamada o "domínio de morte", presente tanto nos receptores quanto nestes alvos citosólicos, que são assim ativados. A ativação de FADD e TRADD inicia uma cascata proteolítica que leva à apoptose. FADD e TRADD ativam a caspase 8, cuja ação libera o citocromo *c* da mitocôndria, o qual, juntamente com a proteína Apaf-1, ativa a caspase 9, desencadeando a apoptose.

ma de pró-enzima. As mitocôndrias são um dos alvos da caspase 8 ativada. A protease causa a liberação de certas proteínas contidas entre a membrana mitocondrial interna e a externa: citocromo *c* (Capítulo 19) e várias caspases "efetoras". O citocromo *c* liga-se à forma pró-enzima da enzima efetora caspase 9 e estimula sua ativação proteolítica. A caspase 9 ativada, por sua vez, catalisa a destruição em larga escala de proteínas celulares – uma das principais causas da morte celular apoptótica. Um alvo específico da ação das caspases é uma desoxirribonuclease ativada por caspase.

Na apoptose, os produtos monoméricos da degradação de proteínas e DNA (aminoácidos e nucleotídeos) são liberados por um processo controlado que permite que eles sejam captados e reutilizados pelas células vizinhas. A apoptose, portanto, possibilita que o organismo elimine uma célula desnecessária, ou potencialmente perigosa, sem desperdiçar seus componentes.

## RESUMO 12.12 Oncogenes, genes supressores tumorais e morte celular programada

- Os oncogenes codificam proteínas de sinalização defeituosas. Pela emissão contínua do sinal para a divisão celular, elas levam à formação de tumores. Os oncogenes são geneticamente dominantes e podem codificar fatores de crescimento, receptores, proteínas G, proteínas-cinases ou reguladores nucleares da transcrição defeituosos.
- Os genes supressores tumorais codificam proteínas reguladoras que normalmente inibem a divisão celular; mutações nestes genes são geneticamente recessivas, mas podem levar à formação de tumores.
- O câncer geralmente é o resultado de um acúmulo de mutações em oncogenes e genes supressores tumorais.
- Quando genes de estabilidade, que codificam proteínas necessárias para o reparo de danos genéticos, são mutados, outras mutações ficam sem reparo, incluindo mutações em proto-oncogenes e genes supressores tumorais que podem levar ao câncer.
- A apoptose é a morte celular programada e controlada que ocorre normalmente durante o desenvolvimento e a vida adulta para livrar o organismo de células desnecessárias, danificadas ou infectadas. A apoptose pode ser iniciada por sinais extracelulares, como o TNF, que agem por meio de receptores da membrana plasmática.

## Termos-chave

*Os termos em negrito estão definidos no glossário.*

**transdução de sinal** 433
**especificidade** 433
**cooperatividade** 434
amplificação 434
**cascata enzimática** 434
modularidade 434
**proteínas de ancoragem** 434
**dessensibilização** 434
**integração** 434
análise de Scatchard 435
**receptores associados a proteínas G (GPCR)** 437
**proteínas ligadoras de nucleotídeos de guanosina** 437
**proteínas G** 437
**segundo mensageiro** 437
**agonista** 438
**antagonista** 438
receptores $\beta$-adrenérgicos 438
receptores hepta-helicoidais 438
**proteína G estimulatória ($G_s$)** 438
adenilil-ciclase 438
proteína-cinase dependente de cAMP (proteína-cinase A; PKA) 438
alça P 441
**proteína ativadora de GTPases(GAP)** 442
**regulador da sinalização por proteínas G (RGS)** 442
**fator de troca de nucleotídeos de guanosina (GEF)** 442
**sequência consenso** 443
$\beta$-arrestina ($\beta$arr; arrestina 2) 446
**cinases dos receptores associados a proteínas G (GRK)** 446
proteína de ligação do elemento de resposta a cAMP (CREB) 446
**proteína G inibitória ($G_i$)** 446
**proteínas adaptadoras** 446
AKAP (proteínas de ancoragem da cinase A) 447
fosfolipase C 447
inositol-1,4,5-trifosfato ($IP_3$) 447
**proteína fluorescente verde (GFP)** 448
**transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET)** 448
proteína-cinase C 450
calmodulina (CaM) 451
proteínas-cinases dependentes de $Ca^{2+}$/calmodulina (CaM-cinases) 451
**receptores tirosina-cinases (RTK)** 453
**autofosforilação** 453
**domínio SH2** 454
**proteínas G pequenas** 455
MAPK 455
**citocina** 457
monofosfato cíclico de 3',5'-guanosina (GMP cíclico, cGMP) 459
proteína-cinase dependente de cGMP (proteína-cinase G; PKG) 459
fator natriurético atrial (ANF) 459
NO-sintase 460
angina pectoris 460
domínios PTB 461
canais iônicos controlados por voltagem 465
receptor nicotínico de acetilcolina 467
ionotrópico 468
**integrina** 470
**elemento de resposta a hormônios (HRE)** 471
**sistemas binários** 473
receptor histidina-cinase 473
regulador da resposta 473
cinases semelhantes a receptores (RLK) 476
**retinal** 477
**rodopsina** 477
**opsina** 477
**transducina** 478
rodopsina-cinase 480
potencial do receptor 481
gostoducina 481
**ciclina** 485
proteína-cinase dependente de ciclina (CDK) 485
**ubiquitina** 487
**proteassomo** 487
**fatores de crescimento** 487
proteína do retinoblastoma (pRb) 488
**oncogene** 489
**proto-oncogene** 489
**genes supressores tumorais** 489
morte celular programada 492
**apoptose** 492

## Leituras adicionais

### Geral


**Cohen, P.** (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation—a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 596-601.
Descrição histórica sobre a fosforilação de proteínas.

**Giepmans, B.N.G., Adams, S.R., Ellisman, M.H., & Tsien, R.Y.** (2006) The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **312**, 217–224.
Uma revisão curta, em nível intermediário, sobre FRET.

**Gomperts, B., Kramer, I.M., & Tatham, P.E.R.** (2009) *Signal Transduction*, 2nd edn, Academic Press, New York.
Clara e lindamente ilustrada descrição de todos os sistemas de sinalização discutidos neste capítulo.

**Marks, F., Klingmüller, U., & Müller-Decker, K.** (2009) *Cellular Signal Processing: An Introduction to the Molecular Mechanisms of Signal Transduction*, Garland Science, New York.

**Pawson, T. & Scott, J.D.** (2005) Protein phosphorylation in signaling—50 years and counting. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 286-290.


### Receptores associados a proteínas G (GPCR)


**Aktories, K.** (2011) Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 487–498.

**Awais, M. & Ozawa, T.** (2011) Illuminating intracellular signaling and molecules for single cell analyisis. *Mol. Biosyst.* **7**, 1376–1387.
Revisão em nível intermediário sobre métodos para a utilização de marcadores fluorescentes em biologia celular e bioquímica.

**Beene, D.L. & Scott, J.D.** (2007) A-kinase anchoring proteins take shape. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 192–198.

**Birnbaumer, L.** (2007) The discovery of signal transduction by G proteins: a personal account and an overview of the initial findings and contributions that led to our present understanding. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1768**, 756–771.

**Escribá, P.V.** (2007) G protein–coupled receptors, signaling mechanisms and pathophysiological relevance. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1768**, 747.
Introdução editorial a uma série de 20 artigos sobre GPCR.

**Francis, S.H., Blount, M.A., & Corbin, J.D.** (2011) Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological function. *Physiol. Rev.* **91**, 651–690.

**Kobilka, B.K.** (2011) Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology. *Trends Pharmacol.* Sci. **32**, 213–218.
Revisão em nível intermediário.

**Kremers, G.-J., Gilbert, S.G., Cranfill, P.J., Davidson, M.W., & Piston, D.W.** (2011) Fluorescent proteins at a glance. *J. Cell Sci.* **124**, 157–160.
Breve revisão sobre a metodologia para a utilização de proteínas marcadas com fluorescência.

**Lefkowitz, R.J.** (2007) Introduction to special section on arrestins. *Annu. Rev. Physiol.* **69**.
Este artigo introduz cinco excelentes revisões aprofundadas sobre as funções da arrestina.

**Malumbres, M.** (2011) Physiological relevance of cell cycle kinases. *Physiol. Rev.* **91**, 973–1007.

Revisão avançada e extensa sobre as funções das proteínas-cinases na regulação do ciclo celular e seus papéis em câncer.

**Pearce, L.R., Komander, D., & Alessi, D.R.** (2010) The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 9–22.
Revisão avançada sobre as famílias das cinases PKA, PKC e PKG.

**Pinna, L.A. & Ruzzene, M.** (1996) How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta* **1314**, 191–225.
Revisão aprofundada sobre os elementos, incluindo as sequências consenso, que originam as especificidades das proteínas-cinases.

**Rasmussen, S.G.F., DeVree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., et al.** (2011) Crystal structure of the $\beta_2$ adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**, 549–555.
A determinação definitiva da estrutura e da interação entre o receptor e a proteína G.

## Receptores enzimáticos

**Garbers, D.L., Chrisman, T.D., Wiegn, P., Katafuchi, T., Albanesi, J.P., Bielinski, V., Barylko, B., Redfield, M.M., & Burnett, J.C., Jr.** (2006) Membrane guanylyl cyclase receptors: an update. *Trends Endocrinol. Metab.* **17**, 251–258.

**Karnoub, A.E. & Weinberg, R.A.** (2008) Ras oncogenes: split personalities. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 517–531.

**Lemmon, M.A. & Schlessinger, J.** (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117–1134.

**Misono, K.S., Philo, J.S., Arakawa, T., Ogata, C.M., Qiu, Y., Ogawa, H., & Young, H.S.** (2011) Structure, signaling mechanism and regulation of the natriuretic peptide receptor guanylate cyclase. *FEBS J.* **278**, 1818–1829.

## Proteínas adaptadoras e balsas lipídicas da membrana

**Dehmelt, L. & Bastiaens, P.I.H.** (2010) Spatial organization of intracellular communication: insights from imaging. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 440–452.

**Good, M.C., Zalatan, J.G., & Lim, W.A.** (2011) Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science* **332**, 680–686.
Revisão em nível intermediário sobre a estrutura e função das proteínas de ancoragem.

**Schwarz-Romond, T. & Gorski, S.A.** (2010) Focus on the spatial organization of signaling. *EMBO J.* **29**, 2675–2676.
Introdução editorial a uma coleção de oito excelentes revisões sobre os aspectos espaciais da sinalização.

**Smith, F.D. & Scott, J.D.** (2006) Anchored cAMP signaling: onward and upward. A short history of compartmentalized cAMP signal transduction. *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 582–592.
Revisão curta, em nível intermediário, que apresenta um exemplar inteiro do periódico sobre o tópico AKAP e sinalização por cAMP.

## Canais iônicos de receptores

***Ver também Capítulo 11, Leituras Adicionais, Canais Iônicos***

**Ashcroft, F.M.** (2006) From molecule to malady. *Nature* **440**, 440–447.
Revisão curta, em nível intermediário, sobre as doenças humanas associadas com defeitos em canais iônicos.

**Changeux, J.-P.** (2010) Allosteric receptors: from electric organ to cognition. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50**, 1–38.

**Grigoryan, G., Moore, D.T., & DeGrado, W.F.** (2011) Transmembrane communication: general principles and lessons from the structure and function of the M2 proton channel, $K^+$ channels, and integrin receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 211–237.
Revisão aprofundada e enriquecedora.

**Tombola, F., Pathak, M.M., & Isacoff, E.Y.** (2006) How does voltage open an íon channel? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 23–52.

## Íons cálcio na sinalização

**Berridge, M.J.** (2009) Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1793**, 933–940.

**Bunney, T.D. & Katan, M.** (2011) PLC regulation: emerging pictures for molecular mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 88–96.
Revisão intermediária sobre a fosfolipase C na sinalização do $Ca^{2+}/IP_3$.

**Chazin, W.J.** (2011) Relating form and function of EF-hand calcium binding proteins. *Acc. Chem. Res.* **44**, 171–179.

**Chin, D. & Means, A.R.** (2000) Calmodulin: a prototypical calcium receptor. *Trends Cell Biol.* **10**, 322–328.

**Haiech, J., Heizmann, C., & Krebs, J.** (eds). (2009) 10th European Symposium on Calcium. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1793, 931–1114.
Todos os artigos neste volume tratam sobre a sinalização por meio do cálcio.

**Parekh, A.B.** (2011) Decoding cytosolic Ca2 oscillations. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 78–87.

## Integrinas

**Harburger, D.S. & Calderwood, D.A. (2009) Integrin signaling at** a glance. *J. Cell Sci.* **122**, 159–163.
Revisão em forma de pôster da sinalização das integrinas.

**Valdembri, D., Sandri, C., Santambrogio, M., & Serini, G.** (2011) Regulation of integrins by conformation and traffic: it takes two to tango. *Mol. Biosyst.* **7**, 2539–2546.

## Receptores e ação de hormônios esteroides

**Biggins, J.B. & Koh, J.T.** (2007) Chemical biology of steroid and nuclear hormone receptors. *Curr. Opin. Chem. Biol*. **11**, 99–110.

**Huang, P., Chandra, V., & Rastinejad, F.** (2010) Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 247–272.

## Sinalização em plantas e bactérias

**Chen, Y.F., Etheridge, N., & Schaller, G.E.** (2005) Ethylene signal transduction. *Ann. Botany* **95**, 901–915.
Revisão em nível intermediário.

**Clouse, S.D.** (2011) Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *Plant Cell* **23**, 1219–1230.

**Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R., & Abrams, S.** (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**, 651–679.

**Dodd, A.N., Kudla, J., & Sanders, D.** (2010) The language of calcium signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**, 593–620.

**Ferreira, F.J. & Kieber, J.J.** (2005) Cytokinin signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 518–525.

**Paciorek, T. & Friml, J.** (2006) Auxin signaling. *J. Cell Sci*. **119**, 1199–1202.

**Pauwels, L. & Goossens, A.** (2011) The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *Plant Cell* **23**, 3089–3100.

**Perry, J., Koteva, K., & Wright, G.** (2011) Receptor domains of two-component signal transduction systems. *Mol. Biosyst.* **7**, 1388–1398.

**Rodriguez, M.C.S., Petersen, M., & Mundy, J.** (2010) Mitogenactivated protein kinase signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**, 621–649.

**Stepanova, A.N. & Alonso, J.M.** (2009) Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 548–555.

**Wang, Z.** (2010) From receptors to responses (in plants). *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**, 485–488.

Introdução editorial a uma série de artigos sobre sinalização em plantas, todos publicados neste exemplar.

### Visão, olfato e paladar

**Kaupp, U.B.** (2010) Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 188–200.

**Smith, S.O.** (2010) Structure and activation of the visual pigment rhodopsin. *Annu. Rev. Biophys.* **39**, 309–328.

Revisão aprofundada.

**Yarmolinsky, D.A., Zuker, C.S., & Ryba, N.J.P.** (2009) Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell* **139**, 234–244.

### Ciclo celular e câncer

**Bublil, E.M. & Yarden, Y.** (2007) The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 124–134.

**Clarke, P.R. & Allan, L.A.** (2009) Cell-cycle control in the face of damage—a matter of life or death. *Trends Cell Biol.* **19**, 89–98.

Revisão intermediária sobre as funções de ATP, p53 e outras proteínas de regulação no ciclo celular.

**Dorsam, R.T. & Gutkind, J.S.** (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature Rev. Cancer.* **7**, 79–94.

**Levine, A.J. & Oren, M.** (2009) The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 749–758.

Perspectiva histórica dos estudos de p53 e câncer.

**Ma, H.T. & Poon, R.Y.C.** (2011) How protein kinases co-ordinate mitosis in animal cells. *Biochem. J.* **435**, 17–31.

**Malumbres, M.** (2011) Physiological relevance of cell cycle kinases *Physiol. Rev.* **91**, 973–1007.

Revisão aprofundada sobre as funções das CDK e outras proteínas-cinases no controle do ciclo celular.

**Markowitz, S.D. & Bertagnolli, M.M.** (2009) Molecular basis of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **361**, 2449–2460.

**Novak, B., Kapuy, O., Domingo-Sananes, M.R., & Tyson, J.J.** (2010) Regulated protein kinases and phosphatases in cell cycle decisions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 801–808.

**Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., & Bar-Sagi, D.** (2011) RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 761–774.

### Apoptose

**Wylie, A.H.** (2010) "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. *Mol. Neurobiol.* **42**, 4–9.

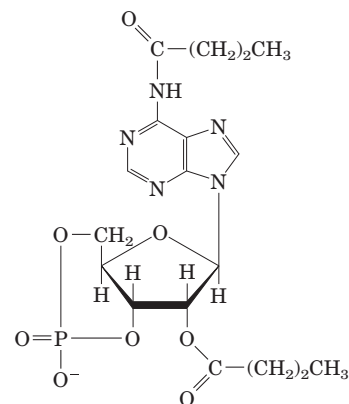
## Problemas

**1. Experimentos com hormônios em sistemas livres de células.** Nos anos de 1950, Earl W. Sutherland, Jr., e seus colegas conduziram experimentos pioneiros para a elucidação do mecanismo de ação da adrenalina e do glucagon. Com base no que você aprendeu neste capítulo sobre a ação hormonal, interprete cada um dos experimentos descritos abaixo. Identifique a substância X e comente a importância dos resultados.

(a) A adição de adrenalina a um homogeneizado de fígado normal resultou em um aumento na atividade da glicogênio-fosforilase. Entretanto, quando o homogeneizado foi primeiramente centrifugado em alta rotação e a adrenalina ou o glucagon foram adicionados à fração sobrenadante que continha a fosforilase, não ocorreu nenhum aumento na atividade da fosforilase.

(b) Quando a fração particulada da centrifugação em (a) foi tratada com adrenalina, a substância X foi produzida. A substância foi isolada e purificada. Ao contrário da adrenalina, a substância X ativou a glicogênio-fosforilase quando adicionada à fração sobrenadante do homogeneizado centrifugado.

(c) A substância X era termoestável; isto é, o tratamento com calor não afetou sua capacidade de ativar a fosforilase. (Dica: seria este o caso se a substância X fosse uma proteína?) A substância X era praticamente idêntica a um composto obtido quando ATP puro era tratado com hidróxido de bário. (A Figura 8-6 será útil.)

**2. A ação de dibutiril-cAMP *versus* cAMP em células intactas.** A ação fisiológica da adrenalina deveria, em princípio, ser mimetizada pela adição de cAMP às células-alvo. Na prática, a adição de cAMP a células-alvo intactas provoca apenas uma resposta fisiológica mínima. Por quê? Quando o derivado estruturalmente relacionado dibutiril-cAMP (mostrado abaixo) é adicionado às células intactas, a resposta fisiológica esperada é prontamente aparente. Explique a base das diferenças das respostas celulares a essas duas substâncias. O dibutiril-cAMP é largamente utilizado nos estudos sobre a função do cAMP.

Dibutiril-cAMP
(Monofosfato cíclico de $N^6$,$O^{2'}$-dibutiril-3′,5′-adenosina)

**3. Efeito da toxina do cólera sobre a adenilil-ciclase.** A bactéria gram-negativa *Vibrio cholerae* produz uma proteína, a toxina do cólera ($M_r$ 90.000), responsável pelos sintomas característicos do cólera: extensa perda de água e $Na^+$ corporais devido à contínua e debilitante diarreia. Se os fluidos corporais e o $Na^+$ não são repostos, a doença resulta em desidratação grave; não tratada, frequentemente é fatal. Quando a toxina do cólera ganha acesso ao trato intestinal humano, ela se liga fortemente a sítios específicos da membrana plasmática das células epiteliais que revestem o intestino delgado, levando à ativação prolongada (horas ou dias) da adenilil-ciclase.

(a) Qual é o efeito da toxina do cólera sobre a [cAMP] das células intestinais?

(b) Com base nas informações, sugira como o cAMP atua normalmente nas células do epitélio intestinal.

(c) Sugira um possível tratamento para o cólera.

**4. Mutações na PKA.** Explique como mutações nas subunidades R ou C da proteína-cinase dependente de cAMP (PKA) poderiam levar a (a) uma PKA permanentemente ativa ou (b) uma PKA permanentemente inativa.

**5. O efeito terapêutico do albuterol.** Os sintomas respiratórios da asma são resultantes da constrição dos brônquios e bronquíolos dos pulmões, causada pela contração do músculo liso de suas paredes. Essa constrição pode ser revertida pelo aumento da [cAMP] no músculo liso. Explique o efeito terapêutico do albuterol, um agonista $\beta$-adrenérgico administrado (por inalação) para asma. Você esperaria alguns efeitos colaterais para este fármaco? Como alguém poderia projetar um fármaco melhor, que não apresentasse esses efeitos colaterais?

**6. Término da sinalização hormonal.** Os sinais transmitidos por hormônios devem, ao final, ser encerrados. Descreva alguns mecanismos diferentes para o término da sinalização.

**7. Utilizando FRET para explorar as interações proteína-proteína *in vivo*.** A Figura 12-8 mostra a interação entre a $\beta$-arrestina e o receptor $\beta$-adrenérgico. Como você utilizaria a FRET (ver Quadro 12-3) para demonstrar esta interação em células vivas? Que proteínas você fusionaria? Quais comprimentos de onda você utilizaria para iluminar as células, e com quais você monitoraria? O que você esperaria observar caso a interação ocorresse? E caso não ocorresse? Como você poderia explicar a falha dessa abordagem para demonstrar esta interação?

**8. Injeção de EGTA.** EGTA (ácido etileno glicol-bis[$\beta$-amino-etil-éter]-*N*,*N*,*N'*,*N'*-tetracético) é um agente quelante com alta afinidade e especificidade para $Ca^{2+}$. Pela microinjeção de uma célula com uma solução apropriada de $Ca^{2+}$-EGTA, um pesquisador pode impedir que a [$Ca^{2+}$] citosólica aumente acima de $10^{-7}$ M. Como a microinjeção de EGTA afetaria a resposta celular ao hormônio antidiurético (ver Tabela 12-4)? E ao glucagon?

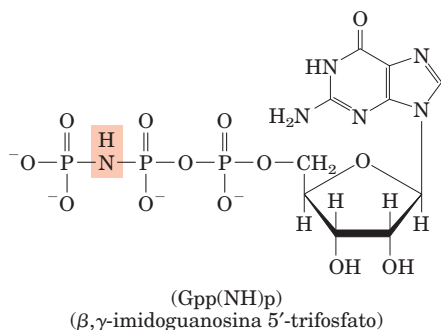
**9. Amplificação dos sinais hormonais.** Descreva todas as fontes de amplificação do sistema do receptor de insulina.

**10. Mutações no *ras*.** Como uma mutação no *ras* que leve à síntese de uma proteína Ras sem atividade GTPásica afetaria a resposta celular à insulina?

**11. Diferenças entre proteínas G.** Compare a proteína $G_s$, que participa da transdução do sinal vindo dos receptores $\beta$-adrenérgicos, com Ras. Que propriedades elas compartilham? Em que são diferentes? Qual é a diferença funcional entre $G_s$ e $G_i$?

**12. Os mecanismos de regulação das proteínas-cinases.** Identifique oito tipos gerais de proteínas-cinases encontradas em células eucarióticas, e explique que fator é *diretamente* responsável pela ativação de cada tipo.

**13. Análogos não hidrolisáveis do GTP.** Muitas enzimas podem hidrolisar o GTP entre os fosfatos $\beta$ e $\gamma$. O análogo do GTP $\beta$,$\gamma$-imidoguanosina 5'-trifosfato (Gpp(NH)p), mostrado abaixo, não pode ser hidrolisado entre os fosfatos $\beta$ e $\gamma$.

(Gpp(NH)p)
($\beta$,$\gamma$-imidoguanosina 5'-trifosfato)

Prediga o efeito sobre a resposta celular ao estímulo $\beta$-adrenérgico da microinjeção de Gpp[NH]p em um miócito.

**14. O uso da ligação de uma toxina para a purificação de uma proteína de canal.** A $\alpha$-bungarotoxina é uma potente neurotoxina encontrada no veneno de uma serpente venenosa (*Bungarus multicinctus*). Ela se liga com alta especificidade ao receptor proteico nicotínico de acetilcolina (AChR) e impede a abertura do canal iônico. Essa interação foi utilizada para a purificação do AChR a partir do órgão elétrico do peixe-elétrico.

(a) Esboce uma estratégia para o uso de $\alpha$-bungarotoxina covalentemente ligada a uma resina cromatográfica para a purificação da proteína AChR. (Dica: ver Figura 3-17c.)

(b) Esboce uma estratégia para o uso de [$^{125}$I]$\alpha$-bungarotoxina para a purificação da proteína AChR.

**15. Potencial de membrana de repouso.** Vários invertebrados incomuns, incluindo bivalves gigantes, mexilhões e poliquetas, vivem nas fontes hidrotermais nas profundezas do oceano, onde a temperatura é de 60°C.

(a) O músculo adutor de um bivalve gigante apresenta um potencial de membrana de repouso igual a -95 mV. Dadas as composições iônicas intracelular e extracelular mostradas abaixo, você prediria esse potencial de membrana? Por quê?

| | Concentração (mM) | |
|---|---|---|
| Íon | Intracelular | Extracelular |
| $Na^+$ | 50 | 440 |
| $K^+$ | 400 | 20 |
| $Cl^-$ | 21 | 560 |
| $Ca^{2+}$ | 0,4 | 10 |

(b) Assuma que a membrana do músculo adutor é permeável a apenas um dos íons listados acima. Qual íon poderia determinar o $V_m$?

**16. O potencial de membrana em óvulos de sapo.** A fertilização de um oócito de sapo por um espermatozoide provoca variações iônicas similares àquelas observadas em neurônios (durante o deslocamento do potencial de ação) e inicia os eventos que resultam em divisão celular e desenvolvimento embrionário. Os oócitos podem ser estimulados a dividirem-se sem a ocorrência da fertilização, ao serem colocados em uma solução de 80 mM KCl (a água de uma lagoa normalmente contém 9 mM KCl).

(a) Calcule em quanto a alteração na [KCl] extracelular varia o potencial de membrana do oócito. (Dica: assuma que o oócito contém 120 mM $K^+$ e é permeável *somente* a $K^+$.) Assuma uma temperatura de 20°C.

(b) Quando esse experimento é repetido em água livre de $Ca^{2+}$, o aumento na [KCl] não tem efeito algum. O que isso sugere a respeito do mecanismo do efeito do KCl?

**17. A excitação provocada pela hiperpolarização.** Na maioria dos neurônios, a *despolarização* da membrana leva à abertura de canais iônicos dependentes de voltagem, à geração de um potencial de ação e, finalmente, ao influxo de $Ca^{2+}$, que causa a liberação do neurotransmissor na extremidade terminal do axônio. Formule uma estratégia celular pela qual a *hiperpolarização* nos bastonetes poderia produzir a excitação da rota de transdução da visão e a passagem do sinal visual ao cérebro. (Dica: a rota de sinalização neuronal em organismos mais evoluídos compreende uma *série* de neurônios que transmite a informação ao cérebro [ver Figura 12-36]. O sinal liberado por um neurônio para o neurônio seguinte, pós-sináptico, pode ser tanto excitatório quanto inibitório.)

**18. "Canalopatias" genéticas.** Existem muitos distúrbios genéticos que resultam de defeitos em canais iônicos. Explique, para cada um dos seguintes, como o defeito molecular pode levar aos sintomas descritos.

(a) Uma mutação de perda de função no gene que codifica a subunidade $\alpha$ do canal de cátions controlado por cGMP dos cones da retina leva à completa incapacidade de distinguir cores.

(b) Alelos de perda de função do gene que codifica a subunidade $\alpha$ do canal de $K^+$ controlado por ATP mostrado na Figura 23-28 levam a uma condição conhecida como hiperinsulinemia congênita – a persistência de altos níveis de insulina no sangue.

(c) As mutações que afetam a subunidade $\beta$ do canal de $K^+$ controlado por ATP e impedem a ligação do ATP levam ao diabetes neonatal – a persistência de baixos níveis de insulina no sangue em bebês recém-nascidos.

**19. A dessensibilização da visão.** A doença de Oguchi é uma forma hereditária de cegueira noturna. Os indivíduos afetados recuperam lentamente a visão após um clarão de luz brilhante contra um fundo escuro como os faróis de um carro em uma autoestrada. Sugira qual(is) defeito(s) molecular(es) pode(m) estar envolvido(s) na doença de Oguchi. Explique em termos moleculares como esse defeito seria responsável pela cegueira noturna.

**20. Efeito de um análogo de cGMP permeante em bastonetes.** Um análogo do cGMP, 8-Br-cGMP, permeante às membranas celulares, é degradado lentamente pela atividade da PDE de um bastonete, sendo tão eficaz quanto o cGMP para a abertura do canal iônico do segmento externo da célula. Se você preparar uma suspensão de bastonetes em um tampão contendo uma [8-Br-cGMP] relativamente alta, e então iluminar as células enquanto mede o potencial de membrana, o que você observaria?

**21. As sensações de quente e frio no paladar.** As sensações de quente e frio são transduzidas por um grupo de canais iônicos controlados pela temperatura. Por exemplo, TRPV1, TRPV3 e TRPM8 estão normalmente fechados, mas se abrem sob as seguintes condições: TRPV1 em $\geq$ 43°C; TRPV3 em $\geq$ 33°C e TRPM8 em $<$ 25°C. Esses canais são expressos em neurônios sensoriais conhecidos por serem responsáveis pela sensação da temperatura.

(a) Proponha um modelo razoável para explicar como a exposição de um neurônio sensorial contendo TRPV1 a uma alta temperatura leva a uma sensação de calor.

(b) A capsaicina, um dos ingredientes ativos das pimentas "quentes", é um agonista de TRPV1. A capsaicina apresenta 50% de ativação da resposta do TRPV1 em uma concentração (ou seja, tem um $EC_{50}$) de 32 nM. Explique por que poucas gotas de um molho apimentado podem dar a sensação de muito "quente", sem, de fato, queimar você.

(c) O mentol, um dos ingredientes ativos da hortelã, é um agonista do TRPM8 ($EC_{50}$ = 30 $\mu$M) e do TRPV3 ($EC_{50}$ = 20 mM). Que sensação você esperaria do contato com baixos níveis de mentol? E com altos níveis?

**22. Oncogenes, genes supressores tumorais e tumores.** Apresente, para as seguintes situações, uma explicação plausível de como elas poderiam levar à divisão celular irrestrita.

(a) As células do câncer de colo frequentemente contêm mutações no gene que codifica o receptor de prostaglandina $E_2$. A $PGE_2$ é um fator de crescimento requerido para a divisão das células do trato gastrintestinal.

(b) O sarcoma de Kaposi, tumor comum em pessoas com Aids não tratada, é causado por um vírus portador de um gene para uma proteína semelhante aos receptores de quimiocinas CXCR1 e CXCR2. As quimiocinas são fatores de crescimento célula-específicos.

(c) Adenovírus, um vírus tumoral, porta um gene para a proteína E1A, que se liga à proteína do retinoblastoma, pRb. (Dica: ver Figura 12-49.)

(d) Uma importante característica de muitos oncogenes e genes supressores tumorais é sua especificidade ao tipo celular. Por exemplo, mutações no receptor de $PGE_2$ não são encontradas em tumores de pulmão. Explique essa observação. (Lembre que a $PGE_2$ age por meio de um GPCR da membrana plasmática.)

**23. Mutações em genes supressores tumorais e oncogenes.** Explique por que mutações em genes supressores tumorais são recessivas (ambas as cópias do gene devem estar defeituosas para que a regulação da divisão celular seja defeituosa) enquanto mutações em oncogenes são dominantes.

**24. Retinoblastoma em crianças.** Explique por que algumas crianças com retinoblastoma desenvolvem múltiplos tumores da retina em ambos os olhos, enquanto outras apresentam um único tumor em um único olho.

**25. A especificidade de um sinal para um único tipo celular.** Discuta a validade do seguinte argumento. Uma molécula sinalizadora (hormônio, fator de crescimento, ou neurotransmissor) induz respostas idênticas em diferentes tipos de células-alvo se elas contiverem receptores idênticos.

## Problema de análise de dados

**26. Explorando a sensação do paladar em camundongos.** A Figura 12-42 mostra a rota de transdução de sinal para o sabor doce em mamíferos. Sabores agradáveis são uma adaptação evolutiva para encorajar os animais a consumirem alimentos nutritivos. Zhao e coautores (2003) examinaram as duas principais sensações prazerosas do paladar: doce e umami. O umami, "distinto sabor salgado" induzido por aminoácidos (em especial, aspartato e glutamato) provavelmente estimula os animais a consumirem alimentos ricos em proteína. O glutamato monossódico (MSG, de *monosodium glutamate*) é um realçador de sabor que explora essa sensibilidade.

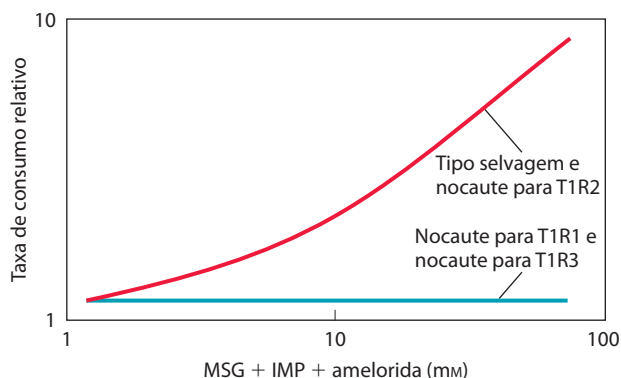
Na época em que o artigo foi publicado, receptores proteicos específicos de sabor (marcados como SR na Figura 12-42) para doce e umami haviam sido parcialmente caracterizados. Três dessas proteínas eram conhecidas – T1R1, T1R2 e T1R3 – as quais atuavam como complexos receptores heterodiméricos. T1R1-T1R3 foi preliminarmente identificado como o receptor para umami, e T1R2-T1R3 como o receptor para doce. Não estava claro como a sensação do paladar era codificada e enviada ao cérebro, e dois possíveis modelos haviam sido sugeridos. No modelo com base nas células, cada uma das células sensoriais de sabor expressa apenas um tipo de receptor; isto é, existem "células doces", "células amargas", "células umami", e assim por diante, e cada tipo celular envia sua informação ao cérebro via um nervo diferente. O cérebro "sabe" qual sabor é detectado pela identidade da fibra nervosa que transmite a mensagem. No modelo com base no receptor, cada célula sensorial de sabor expressa diferentes tipos de receptores e envia diferentes mensagens ao longo da mesma fibra nervosa ao cérebro, e a mensagem é dependente de qual receptor é ativado. Também não estava claro naquela época se havia alguma inte-

ração entre as diferentes sensações do paladar, ou se partes de um sistema sensorial do paladar eram necessárias para as outras sensações do paladar.

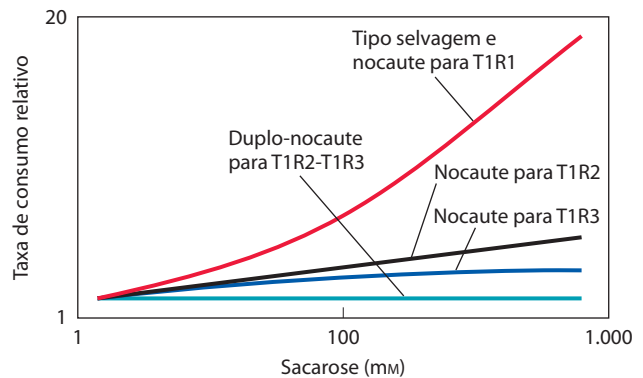
(a) Trabalhos anteriores haviam mostrado que diferentes receptores proteicos de sabor são expressos em conjuntos não sobrepostos de células receptoras de sabor. Que modelo estes trabalhos apoiam? Explique seu raciocínio.

Zhao e colegas construíram um grupo de "camundongos nocaute" – camundongos homozigotos para os alelos de perda de função para um dos três receptores proteicos, T1R1, T1R2 ou T1R3 – e camundongos duplo-nocaute com T1R2 e T1R3 não funcionais. Os pesquisadores mediram a percepção do sabor nesses camundongos por meio da medida da "taxa de consumo" de soluções contendo moléculas de sabores diferentes. Os camundongos lambem o bico de uma mamadeira com solução de sabor agradável mais frequentemente do que o de uma com solução de sabor desagradável. Os pesquisadores mediram taxas de consumo relativas: quão frequentemente os camundongos lamberam uma solução de amostra em comparação com a água. Uma taxa de lambida relativa igual a 1 indica sem preferência; $< 1$, uma aversão; $>1$, uma preferência.

(b) Todas as quatro linhagens de camundongos nocaute apresentaram as mesmas respostas que os camundongos do tipo selvagem aos sabores salgado e amargo. Quais das questões acima foram analisadas neste experimento? O que você conclui a partir desses resultados?

Os pesquisadores, então, estudaram a recepção do sabor umami pela medida das taxas de consumo de diferentes quantidades de MSG na solução de alimentação entre as diferentes linhagens de camundongo. Observe que as soluções também continham monofosfato de inosina (IMP), um potente intensificador da recepção do sabor umami (e um ingrediente comum do macarrão instantâneo tipo lámen, juntamente com o MSG), e amelorida, que suprime o sabor salgado agradável conferido pelo sódio do MSG. Os resultados estão mostrados no gráfico.

(c) Esses resultados são consistentes com o receptor do sabor umami compreendendo um heterodímero de T1R1 e T1R3? Por quê?

(d) Que modelo da codificação dos sabores esses resultados apoiam? Explique seu raciocínio.

Zhao e colegas, então, conduziram uma série de experimentos similares utilizando a sacarose como sabor doce. Os resultados são mostrados abaixo.

(e) Esses dados são consistentes com o receptor do sabor doce compreendendo um heterodímero de T1R2 e T1R3? Por quê?

(f) Houve algumas respostas inesperadas em concentrações de glicose muito altas. Como essas respostas dificultam a ideia de um sistema heterodimérico como o apresentado anteriormente?

Além dos açúcares, os humanos também sentem outros compostos (p. ex., os peptídeos monelina e aspartame) como doces; camundongos não sentem estes peptídeos como doces. Zhao e colegas inseriram no genoma do camundongo nocaute para T1R2 uma cópia do gene de T1R2 humano sob o controle do promotor do T1R2 do camundongo. Esses camundongos modificados agora sentiam monelina e sacarina como doces. Os pesquisadores foram além, inserindo nos camundongos nocaute para T1R1 a proteína RASSL – receptor ligado à proteína G para o opioide sintético espiradolina; o gene da RASSL estava sob o controle de um promotor que poderia ser induzido pela administração de tetraciclina aos camundongos. Esses camundongos não tinham preferência por espiradolina na ausência de tetraciclina; na presença de tetraciclina, mostravam uma forte preferência por concentrações nanomolares de espiradolina.

(g) Como esses resultados fortalecem as conclusões de Zhao e colegas sobre o mecanismo da sensação do paladar?

## Referência

**Zhao, G.Q., Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N.J.P., & Zuker, C.** (2003) The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* **115**, 255–266.

# PARTE II

# Bioenergética e Metabolismo



O metabolismo é uma atividade celular altamente coordenada, em que muitos sistemas multienzimáticos (vias metabólicas) cooperam para (1) obter energia química capturando energia solar ou degradando nutrientes energeticamente ricos obtidos do meio ambiente; (2) converter as moléculas dos nutrientes em moléculas com características próprias de cada célula, incluindo precursores de macromoléculas; (3) polimerizar precursores monoméricos em macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos); e (4) sintetizar e degradar as biomoléculas necessárias para as funções celulares especializadas, como lipídeos de membrana, mensageiros intracelulares e pigmentos.

Embora o metabolismo englobe centenas de diferentes reações catalisadas por enzimas, o grande objetivo da Parte II é o estudo das principais vias metabólicas, poucas em número e notavelmente semelhantes em todas as formas de vida. Os organismos vivos podem ser divididos em dois grandes grupos de acordo com a forma química pela qual obtêm carbono do meio ambiente. Os **autotróficos** (como bactérias fotossintéticas, algas verdes e plantas vasculares) podem usar o dióxido de carbono da atmosfera como sua única fonte de carbono, a partir do qual formam todas as suas biomoléculas constituídas de carbono (ver Figura 1-5). Alguns organismos autotróficos, como as cianobactérias, também podem utilizar nitrogênio atmosférico para gerar todos os seus componentes nitrogenados. Os **heterotróficos** não conseguem utilizar o dióxido de carbono atmosférico e devem obter carbono a partir do ambiente na forma de moléculas orgânicas relativamente complexas, como a glicose. Os animais multicelulares e a maioria dos microrganismos são heterotróficos. As células e os organismos autotróficos são relativamente autossuficientes, enquanto as células e os organismos heterotróficos, por necessitarem de carbono em formas mais complexas, dependem de produtos de outros organismos.

Muitos organismos autotróficos são fotossintéticos e obtêm sua energia da luz solar, enquanto organismos heterotróficos obtêm sua energia a partir da degradação de nutrientes orgânicos produzidos por autotróficos. Em nossa biosfera, os autotróficos e heterotróficos vivem juntos em um ciclo vasto e interdependente em que os organismos autotróficos usam o dióxido de carbono atmosférico para construir suas biomoléculas orgânicas, alguns deles geran-

do oxigênio a partir da água durante o processo. Os organismos heterotróficos, por sua vez, utilizam os produtos orgânicos dos autotróficos como nutrientes e devolvem dióxido de carbono para a atmosfera. Algumas das reações de oxidação que produzem dióxido de carbono também consomem oxigênio, convertendo-o em água. Assim, carbono, oxigênio e água são constantemente reciclados entre os mundos heterotrófico e autotrófico, com a energia solar como a força que impulsiona esse processo global (**Figura 1**).

Todos os organismos vivos também exigem uma fonte de nitrogênio, necessária para a síntese de aminoácidos, nucleotídeos e outros componentes. As bactérias e as plantas, geralmente, podem usar amônia ou nitrato como única fonte de nitrogênio, mas os vertebrados devem obter nitrogênio na forma de aminoácidos ou de outros compostos orgânicos. Somente alguns organismos – as cianobactérias e muitas espécies de bactérias do solo, que vivem simbioticamente sobre as raízes de algumas plantas – são capazes de converter ("fixar") nitrogênio atmosférico ($N_2$) em amônia. Outras bactérias (as bactérias nitrificantes) oxidam amônia em nitritos e nitratos; e outras, ainda, convertem nitrato a $N_2$. As bactérias anamox convertem amônia e nitrito em $N_2$. Portanto, além dos ciclos globais de carbono e oxigênio, um ciclo de nitrogênio opera na biosfera, movimentando enormes quantidades de nitrogênio (**Figura 2**). A reciclagem de carbono, oxigênio e nitrogênio que, em última análise, envolve todas as espécies, depende do equilíbrio adequado entre as atividades dos produtores (autotróficos) e consumidores (heterotróficos) em nossa biosfera.

Esses ciclos de matéria são impulsionados por um enorme fluxo de energia na biosfera, iniciando com a captura da energia solar pelos organismos fotossintéticos e a utilização dessa energia para gerar carboidratos ricos em energia e outros nutrientes orgânicos; esses nutrientes são, então, usados como fontes de energia por organismos heterotróficos. Nos processos metabólicos, e em todas as transformações energéticas, existe uma perda de energia útil (energia livre) e um aumento inevitável na quantidade de energia não utilizável (calor e entropia). Ao contrário da reciclagem de matéria, portanto, a energia flui em uma direção através da biosfera; os organismos não conseguem reciclar energia útil a partir da energia dissipada na forma de calor e entropia. Carbono, oxigênio e nitrogênio são reciclados continuamente, mas energia é constantemente transformada em formas não utilizáveis, como o calor.

**FIGURA 1 Ciclo do dióxido de carbono e do oxigênio entre o domínio autotrófico (fotossintético) e o heterotrófico na biosfera.** O fluxo de massa por esse ciclo é enorme; $4 \times 10^{11}$ toneladas de carbono são recicladas anualmente na biosfera.

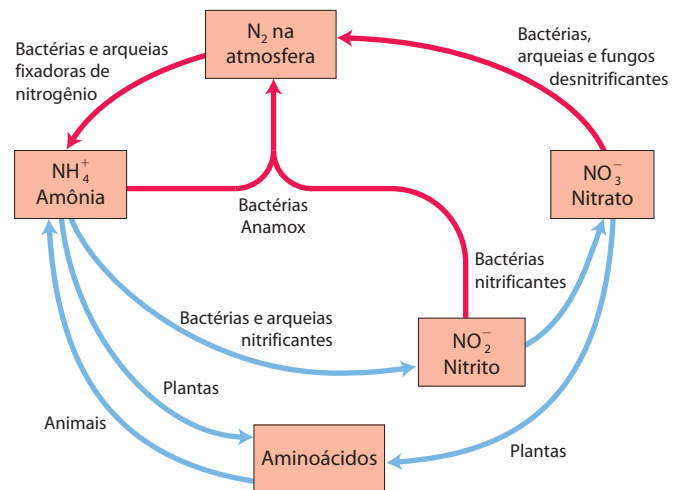



**FIGURA 2 Ciclo do nitrogênio na biosfera.** O nitrogênio ($N_2$) gasoso compreende mais de 80% da atmosfera da Terra.

O **metabolismo**, a soma de todas as transformações químicas que ocorrem em uma célula ou em um organismo, ocorre por meio de uma série de reações catalisadas por enzimas que constituem as **vias metabólicas**. Cada uma das etapas consecutivas em uma via metabólica produz uma pequena alteração química específica, em geral a remoção, a transferência ou a adição de um átomo particular ou um grupo funcional. O precursor é convertido em um produto por meio de uma série de intermediários metabólicos chamados de **metabólitos**. O termo **metabolismo intermediário** frequentemente é aplicado às atividades combinadas de todas as vias metabólicas que interconvertem precursores, metabólitos e produtos de baixo peso molecular (em geral, $M_r < 1.000$).

O **catabolismo** é a fase de degradação do metabolismo, na qual moléculas nutrientes orgânicas (carboidratos, gorduras e proteínas) são convertidas em produtos finais menores e mais simples (como ácido láctico, $CO_2$ e $NH_3$). As vias catabólicas liberam energia, e parte dessa energia é conservada na forma de ATP e de transportadores de elétrons reduzidos (NADH, NADPH e $FADH_2$); o restante é perdido como calor. No **anabolismo**, também chamado de biossíntese, precursores pequenos e simples formam moléculas maiores e mais complexas, incluindo lipídeos, polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos. As reações anabólicas necessitam de fornecimento de energia, geralmente na forma de potencial de transferência do grupo fosforil do ATP e do poder redutor de NADH, NADPH e $FADH_2$ (**Figura 3**).

Algumas vias metabólicas são lineares e algumas são ramificadas, gerando múltiplos produtos finais úteis a partir de um único precursor ou convertendo vários precursores em um único produto. Em geral, as vias catabólicas são *convergentes* e as vias anabólicas são *divergentes* (**Figura 4**). Algumas vias são cíclicas: um composto inicial da via é regenerado em uma série de reações que converte outro componente inicial em um produto. Serão analisados exemplos de cada tipo de via nos capítulos a seguir.

A maioria das células tem as enzimas para realizar tanto a degradação quanto a síntese das categorias importantes de biomoléculas – ácidos graxos, por exemplo. No entanto, a síntese e a degradação simultâneas de ácidos graxos seriam inúteis, e isso é evitado pela regulação recíproca das sequências de reações anabólicas e catabólicas: quando uma sequência está ativa, a outra está suprimida. Tal regulação não poderia ocorrer se as vias anabólicas e catabólicas fossem catalisadas por exatamente o mesmo grupo de enzimas, operando em um sentido para o anabolismo, e no sentido oposto para o catabolismo: a inibição de uma enzima envolvida no catabolismo também inibiria a sequência de reações no sentido do anabolismo. As vias catabólicas e anabólicas que conectam os mesmos produtos finais (p. ex., glicose →→ piruvato, e piruvato →→ glicose) podem empregar muitas das mesmas enzimas, mas invariavelmente pelo menos uma das etapas é catalisada por enzimas diferentes nos sentidos catabólico e anabólico, e essas enzimas constituem pontos de regulação independentes. Além disso, a fim de que as vias anabólicas e catabólicas sejam essencialmente irreversíveis, pelo menos uma das reações específicas de cada sentido deve ser termodinamicamente muito favorável – em outras palavras, uma reação cuja reação inversa é muito desfavorável. Como contribuição adicional à regulação independente das sequências de reações anabólicas e catabólicas, elas geralmente ocorrem em compartimentos celulares distintos: por exemplo, o catabolismo de ácidos graxos na mitocôndria, e a síntese dos ácidos graxos no citosol. As concentrações de intermediários, enzimas e reguladores podem ser mantidas em diferentes níveis nesses compartimentos distintos. Como as vias metabólicas são cineticamente controladas pela concentração do substrato, conjuntos separados de intermediários anabólicos e catabólicos também contribuem para o controle das taxas metabólicas. Esses recursos que separam os processos anabólicos e catabólicos serão de interesse particular em nossa discussão sobre o metabolismo.

**FIGURA 3 A relação energética entre as vias catabólicas e anabólicas.** As vias catabólicas liberam energia química na forma de ATP, NADH, NADPH e $FADH_2$. Esses transportadores de energia são usados em vias anabólicas para converter precursores pequenos em macromoléculas celulares.

As vias metabólicas são reguladas em vários níveis, dentro e fora das células. A regulação mais imediata é a disponibilidade de substrato; quando a concentração intracelular do substrato de uma enzima está próxima ou abaixo do $K_m$ (como é o caso, comumente), a velocidade de reação depende muito da concentração do substrato (ver Figura 6-11). Um segundo tipo de controle rápido dentro da célula é a regulação alostérica (p. 226) por um intermediário metabólico ou por uma coenzima – um aminoácido ou ATP, por exemplo – que sinaliza o estado metabólico no interior da célula. Quando a célula contém uma quantidade de aspartato, por exemplo, suficiente para suas necessidades imediatas, ou quando os níveis celulares de ATP indicam não ser necessário o consumo adicional de combustível no momento, esse sinais inibem alostericamente a atividade de uma ou mais enzimas nas vias pertinentes. Em organismos multicelulares, as atividades metabólicas de tecidos diferentes são reguladas e integradas por fatores de crescimento e hormônios que atuam de fora da célula. Em alguns casos, essa regulação ocorre quase que instantaneamente (algumas vezes em menos de um milissegundo) por alterações nos níveis dos mensageiros intracelulares que, por sua vez, modificam a atividade de enzimas intracelulares por mecanismos alostéricos ou por modificações covalentes, como a fosforilação. Em outros casos, o sinal extracelular modifica a concentração celular de uma enzima alterando a velocidade de sua síntese ou degradação, de tal forma que o efeito é visto apenas em minutos ou horas.

A Parte II inicia com uma discussão sobre os princípios energéticos básicos que governam todo o metabolismo (Capítulo 13). Em seguida, aborda as principais vias metabólicas pelas quais as células obtêm energia a partir da oxidação de vários combustíveis (Capítulos 14 a 19). O Capítulo 19 é o ponto principal da discussão sobre o metabolismo; ele trata do acoplamento de energia quimiosmótica, mecanismo universal em que um potencial eletroquímico trans-

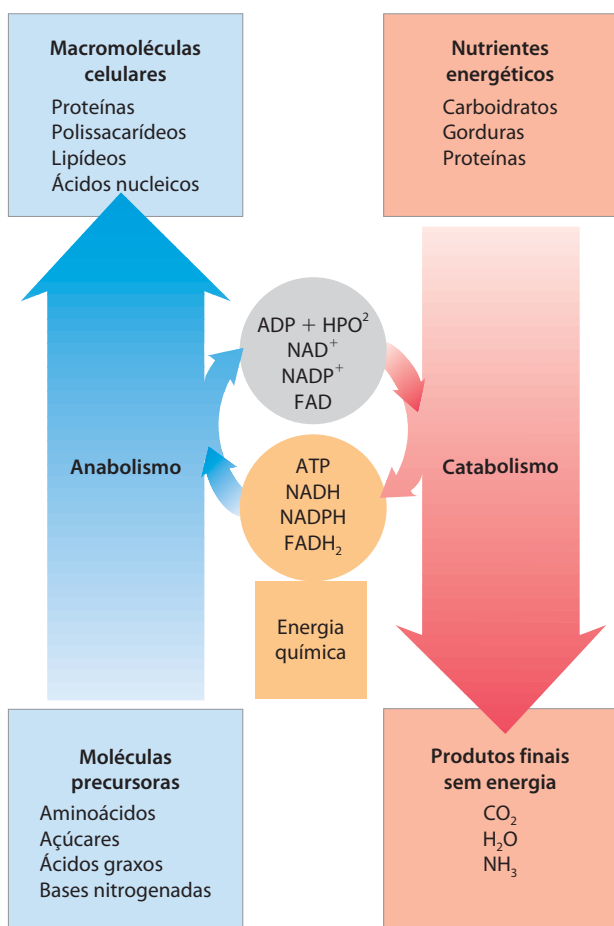
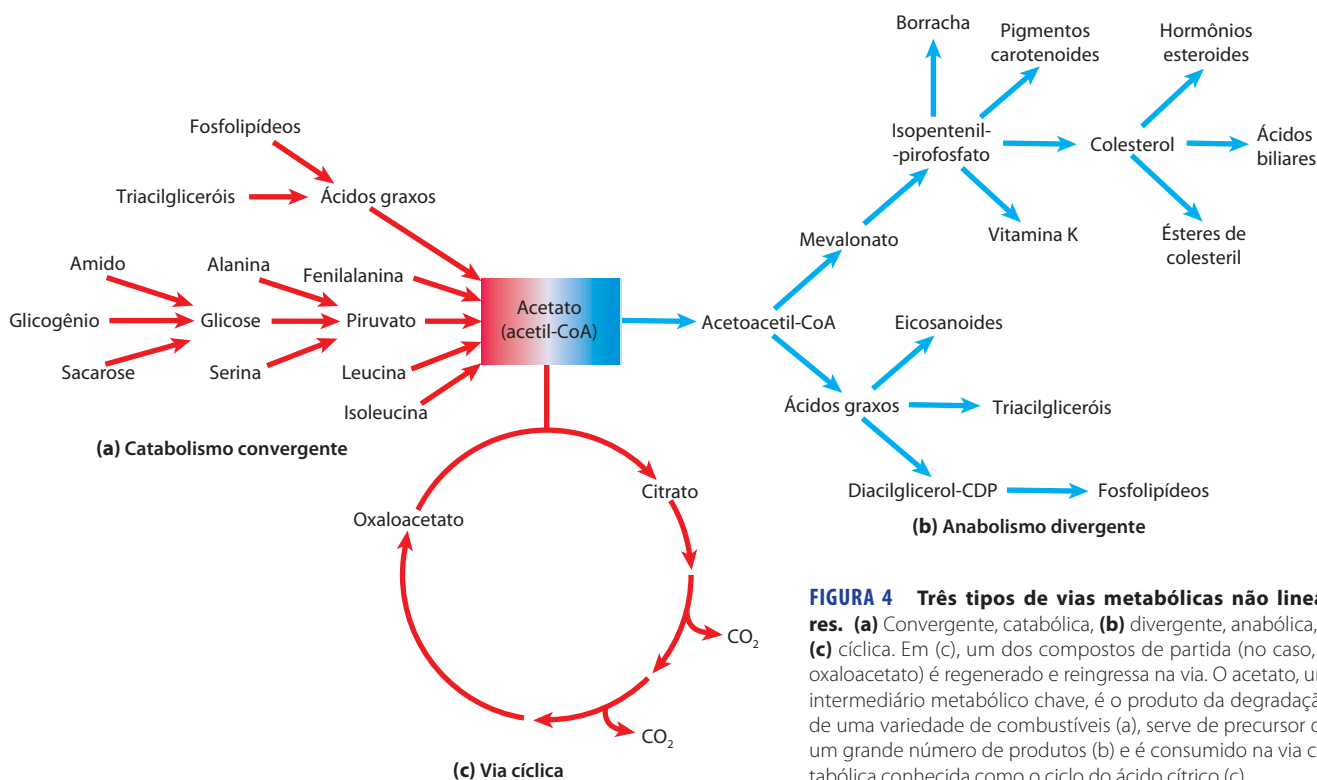



**FIGURA 4 Três tipos de vias metabólicas não lineares.** **(a)** Convergente, catabólica, **(b)** divergente, anabólica, e **(c)** cíclica. Em (c), um dos compostos de partida (no caso, o oxaloacetato) é regenerado e reingressa na via. O acetato, um intermediário metabólico chave, é o produto da degradação de uma variedade de combustíveis (a), serve de precursor de um grande número de produtos (b) e é consumido na via catabólica conhecida como o ciclo do ácido cítrico (c).

membrana, produzido tanto por oxidação de substratos como por absorção de luz, promove a síntese de ATP.

Os Capítulos 20 a 22 descrevem as principais vias anabólicas pelas quais as células utilizam a energia do ATP para produzir carboidratos, lipídeos, aminoácidos e nucleotídeos a partir de precursores mais simples. O Capítulo 23 volta a abordar o estudo das vias metabólicas – como elas ocorrem em todos os organismos, de *Escherichia coli* a humanos – e considera como elas são reguladas e integradas por mecanismos hormonais nos mamíferos.

No momento em que o foco de estudo será o metabolismo intermediário, uma observação final. Não esqueça de que uma grande quantidade das reações descritas nestas páginas ocorre e tem funções fundamentais em organismos vivos. A cada reação e a cada via que você encontrar, questione: o que essa transformação química faz pelo organismo? Como essa via se conecta com as outras vias que operam simultaneamente na mesma célula para produzir a energia e os produtos necessários para a manutenção e o crescimento da célula? Como os diferentes níveis dos mecanismos de regulação cooperam para o balanço metabólico e o fornecimento e consumo de energia, alcançando o estado de equilíbrio dinâmico da vida? Estudando com essa perspectiva, o metabolismo proporciona dados fascinantes e reveladores sobre a vida, com aplicações incontáveis na medicina, agricultura e biotecnologia.

# 13

# Bioenergética e Tipos de Reações Bioquímicas



As células e os organismos vivos devem realizar trabalho para permanecer vivos, crescer e se reproduzir. A capacidade de controlar a energia e direcioná-la para o trabalho biológico é uma propriedade fundamental de todos os organismos vivos; essa capacidade deve ter sido adquirida muito cedo no curso da evolução celular. Os organismos modernos realizam uma notável variedade de transduções da energia, conversões de uma forma de energia em outra. Usam a energia química dos combustíveis para sintetizar macromoléculas complexas, altamente organizadas, a partir de precursores simples. Também convertem a energia química dos combustíveis em gradientes de concentração e em gradientes elétricos, em movimento e calor e, em alguns organismos como o vaga-lume e peixes do fundo do mar, em luz. Os organismos fotossintéticos transformam a energia luminosa em todas essas outras formas de energia.

Os mecanismos químicos envolvidos nas transduções biológicas de energia têm fascinado e desafiado biólogos por séculos a fio. O químico francês Antoine Lavoisier reconheceu que de alguma forma os animais transformam os combustíveis químicos (alimentos) em calor e que esse processo de respiração é essencial para a vida. Ele observou que

Antoine Lavoisier, 1743-1794

> ...em geral, a respiração é nada mais que a combustão lenta de carbono e hidrogênio, semelhante à que ocorre em uma lâmpada ou vela acesa e, desse ponto de vista, animais que respiram são corpos combustíveis que queimam e consomem a si próprios... Alguém poderia dizer que essa analogia entre combustão e respiração não passou despercebida pelos poetas, ou ainda pelos filósofos da antiguidade, já tendo sido relatada e interpretada por eles. Esse fogo roubado dos céus, essa tocha de Prometeu, não representa apenas uma ideia engenhosa e poética, ela é um retrato fiel das operações da natureza, pelo menos para os animais que respiram; portanto, alguns podem dizer, com os antigos, que a tocha da vida ilumina a si mesma no momento em que a criança respira pela primeira vez, e ela só se extingue na morte.[1]

A partir do século XX, aumentou a compreensão sobre a química relacionada à "tocha da vida". As transduções biológicas de energia obedecem às mesmas leis químicas e físicas que governam todos os outros processos naturais. Portanto, é fundamental para um estudante de bioquímica entender essas leis e como elas se aplicam no fluxo de energia na biosfera.

Este capítulo começa revisando as leis da termodinâmica e a relação quantitativa entre energia livre, entalpia e entropia. Em seguida, revisa os tipos comuns de reações bioquímicas que ocorrem em células vivas, reações que controlam, armazenam, transferem e liberam a energia adquirida pelos organismos do seu meio ambiente. Focaliza, então, as reações com funções especiais nas trocas biológicas de energia, particularmente aquelas envolvendo ATP. Finalmente, considera a importância das reações de oxidação-redução em células vivas, as variações energéticas nas transferências biológicas de elétrons, e os transportadores de elétrons comumente utilizados como cofatores nestes processos.

---

[1]Memorial redigido por Armand Seguir e Antoine Lavoisier, 1789, citado em Lavoisier, A. (1862) *Oeuvres de Lavoisier*. Imprimerie Impériale, Paris.

## 13.1 Bioenergética e termodinâmica

Bioenergética é o estudo quantitativo das **transduções energéticas** que ocorrem em células vivas – mudança de uma forma de energia a outra – bem como da natureza e da função dos processos químicos envolvidos nessas transduções. Embora muitos dos princípios da termodinâmica tenham sido introduzidos em capítulos anteriores, podendo, assim, já serem familiares a você, uma revisão dos aspectos quantitativos desses princípios será útil.

### As transformações biológicas de energia obedecem às leis da termodinâmica

Muitas observações quantitativas feitas por físicos e químicos sobre a interconversão de diferentes formas de energia levaram, no século XIX, à formulação das duas leis fundamentais da termodinâmica. A primeira lei é o princípio da conservação da energia: *para qualquer mudança física ou química, a quantidade total de energia no universo permanece constante; a energia pode mudar de forma ou pode ser transportada de uma região para outra, mas não pode ser criada ou destruída*. A segunda lei da termodinâmica, que pode ser enunciada de diferentes formas, diz que o universo sempre tende para o aumento da desordem: *em todos os processos naturais, a entropia do universo aumenta*.

"Agora, na *segunda* lei da termodinâmica..."

Organismos vivos são formados por uma coleção de moléculas, cujo grau de organização é muito maior que o dos componentes do seu meio ambiente a partir dos quais eles são formados, e os organismos produzem e mantêm a organização, aparentemente imunes a segunda lei da termodinâmica. No entanto, os organismos não violam a segunda lei; eles operam em rigorosa concordância com ela. Para discutir as aplicações da segunda lei aos sistemas biológicos, deve-se primeiro definir esses sistemas e o seu meio ambiente.

O sistema reagente é a coleção de componentes que estão sendo submetidos a um determinado processo químico ou físico; pode ser um organismo, uma célula, ou dois compostos reagentes. Juntos, o sistema reagente e o seu meio ambiente constituem o universo. No laboratório, alguns processos físicos e químicos podem ser realizados isolados ou em sistemas fechados, nos quais não existe troca de material ou energia com o meio. No entanto, células vivas e organismos são sistemas abertos, trocando tanto matéria quanto energia com o seu meio ambiente; os sistemas biológicos jamais atingem o equilíbrio com o seu meio ambiente, e a constante interação entre o sistema e o meio explica como os organismos podem se auto-organizar enquanto operam de acordo com a segunda lei da termodinâmica.

No Capítulo 1 (p. 23) foram definidos três parâmetros termodinâmicos que descrevem as trocas de energia que ocorrem em reações químicas:

**Energia livre de Gibbs, *G***, expressa a quantidade de energia capaz de realizar trabalho durante uma reação à temperatura e pressão constantes. Quando uma reação ocorre com a liberação de energia livre (ou seja, quando o sistema se transforma de modo a possuir menos energia livre), a variação da energia livre, $\Delta G$, possui um valor negativo e a reação é chamada de exergônica. Nas reações endergônicas, o sistema adquire energia livre e o $\Delta G$ é positivo.

**Entalpia, *H***, é o conteúdo de calor do sistema reagente. Ela reflete o número e o tipo de ligações químicas nos reagentes e produtos. Quando uma reação química libera calor, ela é denominada exotérmica; o conteúdo de calor dos produtos é menor do que o dos reagentes, e $\Delta H$ possui, por convenção, um valor negativo. Os sistemas reagentes que captam calor do meio são endotérmicos e possuem valores positivos de $\Delta H$.

**Entropia, *S***, é uma expressão quantitativa da aleatoriedade ou desordem de um sistema (ver Quadro 1-3). Quando os produtos de uma reação são menos complexos e mais desordenados do que os reagentes, a reação ocorre com ganho de entropia.

As unidades de $\Delta G$ e $\Delta H$ são joules/mol ou calorias/mol (lembre que 1 cal = 4,184 J); a unidade de entropia é joules/mol · Kelvin (J/mol · K) (Tabela 13-1).

Sob as condições existentes nos sistemas biológicos (incluindo temperatura e pressão constantes), as variações de energia livre, entalpia e entropia estão quantitativamente relacionadas pela equação

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \qquad (13\text{-}1)$$

em que $\Delta G$ é a variação da energia livre de Gibbs do sistema reagente, $\Delta H$ é a variação da entalpia do sistema, $T$ é a temperatura absoluta, e $\Delta S$ é a variação na entropia do sistema. Por convenção, $\Delta S$ possui sinal positivo quando a entropia aumenta e $\Delta H$, como mencionado anteriormente, possui sinal negativo quando o sistema libera calor para o meio. Qualquer uma dessas condições, típicas de processos

**TABELA 13-1** Algumas constantes físicas e unidades utilizadas na termodinâmica

| |
|---|
| Constante de Boltzmann, $\mathbf{k} = 1{,}381 \times 10^{-23}$ J/K |
| Número de Avogadro, $N = 6{,}022 \times 10^{23}$ mol$^{-1}$ |
| Constante de Faraday, $\mathcal{F} = 96.480$ J/V · mol |
| Constante dos gases, $R = 8{,}315$ J/mol · K |
| (= 1,987 cal/mol · K) |
| A unidade de $\Delta G$ e $\Delta H$ é J/mol (ou cal/mol) |
| A unidade de $\Delta S$ é J/mol · K (ou cal/mol · K) |
| 1 cal = 4,184 J |
| A unidade de temperatura absoluta, $T$, é o grau Kelvin, K |
| 25°C = 298 K |
| A 25°C, $RT = 2{,}478$ kJ/mol |
| (= 0,592 kcal/mol) |

energeticamente favoráveis, tendem a tornar negativo o valor de $\Delta G$. De fato, o valor de $\Delta G$ de um sistema reagente espontâneo é sempre negativo.

A segunda lei da termodinâmica afirma que a entropia *do universo* aumenta durante todos os processos químicos e físicos, embora o aumento da entropia não ocorra necessariamente *no próprio sistema reagente*. A organização produzida dentro das células, à medida que elas crescem e se dividem, é mais do que compensada pela desordem gerada no meio no curso do crescimento e da divisão (ver Quadro 1-3, caso 2). Em resumo, os organismos vivos preservam sua organização interna por captarem a energia livre do meio na forma de nutrientes ou luz solar, e devolverem a ele uma quantidade de energia igual, na forma de calor e entropia.

## As células necessitam de fontes de energia livre

As células são sistemas isotérmicos – elas funcionam essencialmente em temperaturas constantes (e também em pressão constante). O fluxo de calor não é uma fonte de energia para as células, já que o calor é capaz de realizar trabalho somente quando passa por uma região ou por um objeto com temperatura inferior. A energia que as células podem e devem utilizar é a energia livre, descrita como uma função da energia livre de Gibbs, $G$, que permite predizer o sentido das reações químicas, sua posição de equilíbrio exata, e a quantidade de trabalho que elas podem (em teoria) realizar em temperatura e pressão constantes. As células heterotróficas adquirem energia livre a partir das moléculas de nutrientes, e as células fotossintetizantes adquirem energia livre da radiação solar absorvida. Os dois tipos de células tranformam essa energia livre em ATP e em outros compostos ricos em energia, capazes de fornecer energia para a realização de trabalho biológico em temperatura constante.

## A variação da energia livre padrão está diretamente relacionada à constante de equilíbrio

A composição de um sistema reagente (uma mistura de reagentes e produtos químicos) tende à variação contínua até que o equilíbrio seja atingido. Nas concentrações de equilíbrio dos reagentes e dos produtos, as velocidades das reações direta e inversa são exatamente as mesmas, e não ocorre variação líquida adicional do sistema. As concentrações dos reagentes e dos produtos *no equilíbrio* definem a constante de equilíbrio, $K_{eq}$ (p. 25). Na reação geral aA + bB $\rightleftharpoons$ cC + dD, onde $a$, $b$, $c$ e $d$ são o número de moléculas de A, B, C e D que participam da reação, a constante de equilíbrio é dada por

$$K_{eq} = \frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b} \qquad (13\text{-}2)$$

onde [A], [B], [C] e [D] são as concentrações molares dos componentes da reação no ponto de equilíbrio.

Quando o sistema reagente não está em equilíbrio, a tendência em direção ao equilíbrio representa uma força motriz cuja intensidade pode ser expressa como a variação de energia livre para a reação, $\Delta G$. Em condições-padrão (298 K = 25°C), quando os reagentes e os produtos estão presentes em concentração igual a 1 M ou, para os gases, em pressão parcial de 101,3 quilopascais (kPa), ou 1 atm, a força que move o sistema na direção do equilíbrio é definida como a variação de energia livre padrão, $\Delta G°$. Por esta definição, o estado-padrão para as reações que envolvem íons hidrogênio é $[H^+] = 1$ M, ou pH 0. A maior parte das reações bioquímicas, no entanto, ocorre em soluções aquosas devidamente tamponadas em valores de pH próximos a 7; tanto o pH como a concentração da água (55,5 M) são essencialmente constantes.

**CONVENÇÃO-CHAVE:** Para conveniência dos cálculos, os bioquímicos definem o estado-padrão como diferente daquele utilizado por químicos e físicos: no estado-padrão bioquímico, $[H^+]$ é $10^{-7}$ M (pH 7) e $[H_2O]$ é 55,5 M. Para as reações que envolvem $Mg^{2+}$ (que inclui a maioria daquelas nas quais o ATP é um reagente), a $[Mg^{2+}]$ em solução é comumente considerada constante em 1 mM. ■

As constantes físicas com base nesse estado-padrão bioquímico são chamadas de **constantes-padrão aparentes** e são escritas com uma apóstrofe (como $\Delta G'°$ e $K'_{eq}$) para distingui-las das constantes não aparentes utilizadas pelos químicos e físicos. (Note que a maioria dos outros livros-texto usa o símbolo $\Delta G°'$ em vez de $\Delta G'°$. O uso de $\Delta G'°$, recomendado por um comitê internacional de químicos e bioquímicos, visa enfatizar que a energia livre aparente, $\Delta G'$, é o critério para o equilíbrio.) Por simplicidade, daqui por diante essas constantes aparentes serão chamadas de **variações de energia livre padrão**.

**CONVENÇÃO-CHAVE:** Em uma outra convenção para simplificação utilizada pelos bioquímicos, quando $H_2O$, $H^+$ e/ou $Mg^{2+}$ são reagentes ou produtos, as suas concentrações não são incluídas nas equações, como na Equação 13-2, mas estão incorporadas nas constantes $K'_{eq}$ e $\Delta G'°$. ■

Assim como a $K'_{eq}$ é uma constante física característica para cada reação, $\Delta G'°$ também é uma constante. Conforme

foi mencionado no Capítulo 6, existe uma relação simples entre $K'_{eq}$ e $\Delta G'^\circ$:

$$\Delta G'^\circ = -RT \ln K'_{eq} \qquad (13\text{-}3)$$

*A variação de energia livre padrão de uma reação química é simplesmente uma forma matemática alternativa para expressar sua constante de equilíbrio*. A Tabela 13-2 mostra a relação entre $\Delta G'^\circ$ e $K'_{eq}$. Se a constante de equilíbrio para uma determinada reação for igual a 1,0, a variação de energia livre padrão dessa reação é igual a zero (o logaritmo natural de 1,0 é zero). Se a $K'_{eq}$ de uma reação for maior que 1,0, seu $\Delta G'^\circ$ é negativo. Se $K'_{eq}$ for menor que 1,0, seu $\Delta G'^\circ$ é positivo. Como a relação entre $\Delta G'^\circ$ e $K'_{eq}$ é exponencial, variações relativamente pequenas em $\Delta G'^\circ$ correspondem a uma grande mudança em $K'_{eq}$.

Pode ser útil pensar na variação de energia livre de outra forma. $\Delta G'^\circ$ é a diferença entre o conteúdo de energia livre dos produtos e o conteúdo de energia livre dos reagentes, em condições-padrão. Quando $\Delta G'^\circ$ é negativo, os produtos contêm menos energia livre do que os reagentes e a reação ocorrerá espontaneamente em condições-padrão; todas as reações químicas tendem a seguir no sentido que resulta em um decréscimo na energia livre do sistema. Um valor positivo de $\Delta G'^\circ$ significa que os produtos da reação contêm mais energia livre do que os reagentes, e essa reação tenderá a seguir no sentido inverso, se iniciarmos com concentrações iguais a 1,0 M para todos os componentes (condições-padrão). A Tabela 13-3 resume esses pontos.

**TABELA 13-2** Relação entre as constantes de equilíbrio e as variações de energia livre das reações químicas

| | $\Delta G'^\circ$ | |
|---|---|---|
| $K'_{eq}$ | (kJ/mol) | (kcal/mol)* |
| $10^3$ | −17,1 | −4,1 |
| $10^2$ | −11,4 | −2,7 |
| $10^1$ | −5,7 | −1,4 |
| 1 | 0,0 | 0,0 |
| $10^{-1}$ | 5,7 | 1,4 |
| $10^{-2}$ | 11,4 | 2,7 |
| $10^{-3}$ | 17,1 | 4,1 |
| $10^{-4}$ | 22,8 | 5,5 |
| $10^{-5}$ | 28,5 | 6,8 |
| $10^{-6}$ | 34,2 | 8,2 |

* Embora joules e quilojoules sejam as unidades padrão de energia e as utilizadas neste texto, algumas vezes os bioquímicos e nutricionistas expressam os valores de $\Delta G'^\circ$ em quilocalorias por mol. Consequentemente, foram incluídos valores tanto em quilojoules como em quilocalorias nesta tabela e nas Tabelas 13-4 e 13-6. Para converter quilojoules em quilocalorias, divida o número de quilojoules por 4,184.

**TABELA 13-3** Relação entre os valores de $K'_{eq}$ e $\Delta G'^\circ$ e o sentido das reações químicas

| Quando $K'_{eq}$ é... | $\Delta G'^\circ$ é... | Iniciando com 1 M de todos os componentes, a reação... |
|---|---|---|
| > 1,0 | negativo | ocorre no sentido direto |
| 1,0 | zero | está no equilíbrio |
| < 1,0 | positivo | ocorre no sentido inverso |

**PROBLEMA RESOLVIDO 13-1** **Cálculo de $\Delta G'^\circ$**

Calcule a variação de energia livre padrão da reação catalisada pela enzima fosfoglicomutase:

$$\text{Glicose-1-fosfato} \rightleftharpoons \text{glicose-6-fosfato}$$

sendo que, iniciando a reação com 20 mM de glicose-1--fosfato e ausência de glicose-6-fosfato, o equilíbrio final da mistura a 25°C e pH 7,0 contém 1,0 mM de glicose-1-fosfato e 19 mM de glicose-6-fosfato. A reação no sentido da formação de glicose-6-fosfato ocorre com perda ou ganho de energia livre?

**Solução:** Primeiro calcula-se a constante de equilíbrio:

$$K'_{eq} = \frac{[\text{glicose-6-fosfato}]}{[\text{glicose-1-fosfato}]} = \frac{19 \text{ mM}}{1{,}0 \text{ mM}} = 19$$

Agora, é possível calcular a variação de energia livre padrão:

$$\begin{aligned}\Delta G'^\circ &= -RT \ln K'_{eq} \\ &= -(8{,}315 \text{ J/mol}\cdot\text{K})(298 \text{ K})(\ln 19) \\ &= -7{,}3 \text{ kJ/mol}\end{aligned}$$

Como a variação de energia livre padrão é negativa, a conversão de glicose-1-fosfato em glicose-6-fosfato ocorre com perda (liberação) de energia livre. (Para a reação inversa, o $\Delta G'^\circ$ contém a mesma magnitude, mas o sinal *oposto*.)

A Tabela 13-4 fornece a variação de energia livre padrão para algumas reações químicas representativas. Note que a hidrólise de ésteres simples, amidas, peptídeos e glicosídeos, assim como os rearranjos e as eliminações, ocorre com variações relativamente pequenas de energia livre padrão, enquanto a hidrólise de anidridos ácidos é acompanhada pelo decréscimo relativamente grande da energia livre padrão. A oxidação completa de compostos orgânicos como a glicose ou o palmitato em $CO_2$ e $H_2O$, reações que requerem muitas etapas nas células, resulta em um decréscimo muito grande da energia livre padrão. No entanto, as variações de energia livre padrão, como aquelas da Tabela 13-4, indicam o quanto de energia livre está disponível a partir de uma reação em *condições-padrão*. Para descrever a energia liberada sob as condições existentes nas células, é essencial uma expressão para a variação de energia livre *real*.

**TABELA 13-4** Variações de energia livre padrão de algumas reações químicas

| Tipo de reação | $\Delta G'^\circ$ (kJ/mol) | $\Delta G'^\circ$ (kcal/mol) |
|---|---|---|
| **Reações de hidrólise** | | |
| Anidridos de ácidos | | |
| Anidrido acético + $H_2O \longrightarrow$ 2 acetato | −91,1 | −21,8 |
| ATP + $H_2O \longrightarrow$ ADP + $P_i$ | −30,5 | −7,3 |
| ATP + $H_2O \longrightarrow$ AMP + $PP_i$ | −45,6 | −10,9 |
| $PP_i$ + $H_2O \longrightarrow 2P_i$ | −19,2 | −4,6 |
| UDP-glicose + $H_2O \longrightarrow$ UMP + glicose-1-fosfato | −43,0 | −10,3 |
| Ésteres | | |
| Acetato de etila + $H_2O \longrightarrow$ etanol + acetato | −19,6 | −4,7 |
| Glicose-6-fosfato + $H_2O \longrightarrow$ glicose + $P_i$ | −13,8 | −3,3 |
| Amidas e peptídeos | | |
| Glutamina + $H_2O \longrightarrow$ glutamato + $NH_4^+$ | −14,2 | −3,4 |
| Glicilgliena + $H_2O \longrightarrow$ 2 glicina | −9,2 | −2,2 |
| Glicosídeos | | |
| Maltose + $H_2O \longrightarrow$ 2 glicose | −15,5 | −3,7 |
| Lactose + $H_2O \longrightarrow$ glicose + galactose | −15,9 | −3,8 |
| **Rearranjos** | | |
| Glicose-1-fosfato $\longrightarrow$ glicose-6-fosfato | −7,3 | −1,7 |
| Frutose-6-fosfato $\longrightarrow$ glicose-6-fosfato | −1,7 | −0,4 |
| **Eliminação de água** | | |
| Malato $\longrightarrow$ fumarato + $H_2O$ | 3,1 | 0,8 |
| **Oxidação com oxigênio molecular** | | |
| Glicose + $6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$ | −2.840 | −686 |
| Palmitato + $23O_2 \longrightarrow 16CO_2 + 16H_2O$ | −9.770 | −2.338 |

## A variação de energia livre real depende das concentrações dos reagentes e dos produtos

É preciso ter cuidado ao distinguir entre duas grandezas diferentes: a variação de energia livre real, $\Delta G$, e a variação de energia livre padrão, $\Delta G'^\circ$. Cada reação química possui uma variação de energia livre padrão característica, que pode ser positiva, negativa ou nula, dependendo da constante de equilíbrio da reação. A variação de energia livre padrão nos diz em que sentido e até onde uma dada reação deve seguir para atingir o equilíbrio *quando a concentração inicial de cada componente é 1,0* M, em pH 7,0, temperatura de 25°C e pressão de 101,3 kPa (1 atm). Assim, $\Delta G'^\circ$ é constante, tendo um valor característico e imutável para uma dada reação. No entanto, a variação da energia livre *real*, $\Delta G$, é uma função das concentrações dos reagentes e produtos e da temperatura que prevalece durante a reação, e nenhum desses parâmetros será necessariamente igual às condições-padrão, como definidas anteriormente. Além disso, o $\Delta G$ de qualquer reação que ocorra espontaneamente em direção ao seu equilíbrio é sempre negativo, torna-se menos negativo ao longo da reação, e é zero no ponto de equilíbrio, indicando que não pode mais ser realizado trabalho pela reação.

$\Delta G$ e $\Delta G'^\circ$ para uma determinada reação aA + bB $\rightleftharpoons$ cC + dD estão relacionados pela equação

$$\Delta G = \Delta G'^\circ + RT \ln \frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b} \quad (13\text{-}4)$$

na qual os termos em vermelho são aqueles que *realmente prevalecem* no sistema em observação. A concentração dos termos nessa equação expressa o efeito comumente chamado de ação das massas, e o termo $[C]^c[D]^d/[A]^a[B]^b$ é chamado de **razão da ação das massas**, **Q**. Assim, a Equação 13-4 pode ser expressa como $\Delta G = \Delta G'^\circ + RT \ln Q$. Como exemplo, supõe-se que a reação A + B $\rightleftharpoons$ C + D esteja

ocorrendo em condições-padrão de temperatura (25°C) e pressão (101,3 kPa), mas que as concentrações de A, B, C e D *não sejam* iguais e nenhum dos componentes esteja presente na concentração-padrão de 1,0 M. Para determinar a variação de energia livre real, $\Delta G$, nessa condição não padrão de concentração à medida que a reação ocorre da esquerda para a direita, simplesmente aplicam-se as concentrações *reais* de A, B, C e D na Equação 13-4; os valores de $R$, $T$ e $\Delta G'^{\circ}$ são os valores-padrão. $\Delta G$ é negativo e se aproxima do zero à medida que a reação evolui, já que as concentrações reais de A e B diminuem e as concentrações de C e D aumentam. Note que quando a reação está no equilíbrio – quando não há mais força que estimule a reação em nenhum dos sentidos e $\Delta G$ é zero – a Equação 13-4 reduz-se a

$$0 = \Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln \frac{[C]_{eq}[D]_{eq}}{[A]_{eq}[B]_{eq}}$$

ou

$$\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{eq}$$

que é a equação que relaciona a variação de energia livre padrão e a constante de equilíbrio (Equação 13-3).

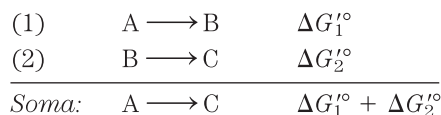
O critério para avaliar a espontaneidade de uma reação é o valor de $\Delta G$, e não de $\Delta G'^{\circ}$. Uma reação com $\Delta G'^{\circ}$ positivo pode ocorrer no sentido direto *se* o $\Delta G$ *for negativo*. Isto é possível se o termo $RT$ ln ([produtos]/[reagentes]) na Equação 13-4 for negativo e possuir valor absoluto maior que $\Delta G'^{\circ}$. Por exemplo, a remoção imediata dos produtos de uma reação pode manter a relação [produtos]/[reagentes] muito abaixo de 1, de forma que o termo $RT$ ln ([produtos]/[reagentes]) apresenta um grande valor negativo. $\Delta G'^{\circ}$ e $\Delta G$ são expressões da quantidade *máxima* de energia livre que uma dada reação pode *teoricamente* liberar – uma quantidade de energia que poderia ser utilizável apenas mediante a presença de um dispositivo muito eficiente para captá-la ou dirigi-la. Já que tal dispositivo não é factível (parte da energia sempre é perdida para a entropia durante qualquer processo), a quantidade de trabalho realizada pela reação a temperatura e pressão constantes é sempre menor que a quantidade teoricamente disponível.

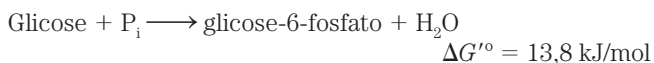
Outro ponto importante é que algumas reações termodinamicamente favoráveis (ou seja, reações em que o $\Delta G'^{\circ}$ é grande e negativo) não ocorrem em velocidades mensuráveis. Por exemplo, a combustão da lenha em $CO_2$ e $H_2O$ é muito favorável termodinamicamente, mas a lenha permanece estável por anos já que a energia de ativação (ver Figuras 6-2 e 6-3) para a reação de combustão é maior do que a energia disponível à temperatura ambiente. Se a energia de ativação necessária é fornecida (p. ex., por um fósforo aceso), a combustão terá início, convertendo a madeira nos produtos mais estáveis $CO_2$ e $H_2O$, e liberando energia nas formas de calor e luz. O calor liberado por essa reação exotérmica fornece a energia de ativação para a combustão das regiões vizinhas à lenha; o processo é autopropagável.

Em células vivas, as reações que seriam extremamente lentas, caso não fossem catalisadas, prosseguem não pelo fornecimento de calor adicional, mas sim pela redução da energia de ativação pelo uso de enzimas. Uma enzima fornece uma via de reação alternativa com energia de ativação menor do que a reação não catalisada, de tal forma que, à temperatura ambiente, uma grande fração das moléculas de substrato possui energia térmica suficiente para superar a barreira de ativação, aumentando drasticamente a velocidade da reação. A *variação de energia livre para uma reação é independente da via pela qual a reação ocorre*; ela depende apenas da natureza e das concentrações dos reagentes iniciais e produtos finais. Portanto, *as enzimas não podem alterar as constantes de equilíbrio*; mas o que elas fazem é aumentar a velocidade pela qual a reação ocorre no sentido determinado pela termodinâmica (ver Seção 6.2).

## As variações de energia livre padrão são aditivas

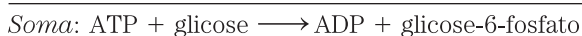
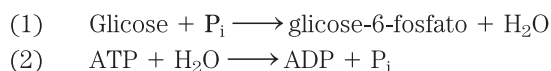
No caso de duas reações químicas sequenciais, A $\rightleftharpoons$ B e B $\rightleftharpoons$ C, cada reação possui sua própria constante de equilíbrio e cada uma possui sua variação de energia livre padrão característica, $\Delta G'^{\circ}_1$ e $\Delta G'^{\circ}_2$. Como as duas reações são sequenciais, B é cancelado, resultando na reação geral A $\rightleftharpoons$ C, que possui sua própria constante de equilíbrio e, consequentemente, sua própria variação de energia livre padrão, $\Delta G'^{\circ}_{total}$. Os *valores de* $\Delta G'^{\circ}$ *de reações químicas sequenciais são aditivos*. Para a reação geral A $\rightleftharpoons$ C, o $\Delta G'^{\circ}_{total}$ é a soma das variações de energia livre padrão individuais, $\Delta G'^{\circ}_1$ e $\Delta G'^{\circ}_2$, das duas reações separadas: $\Delta G'^{\circ}_{total} = \Delta G'^{\circ}_1 + \Delta G'^{\circ}_2$.

| | | |
|---|---|---|
| (1) | $A \longrightarrow B$ | $\Delta G'^{\circ}_1$ |
| (2) | $B \longrightarrow C$ | $\Delta G'^{\circ}_2$ |
| *Soma:* | $A \longrightarrow C$ | $\Delta G'^{\circ}_1 + \Delta G'^{\circ}_2$ |

Este princípio da bioenergética explica como uma reação termodinamicamente desfavorável (endergônica) pode ocorrer no sentido direto, acoplando-a a uma reação altamente exergônica, por meio de um intermediário comum. Por exemplo, a síntese de glicose-6-fosfato é o primeiro passo na utilização de glicose em muitos organismos:

$$\text{Glicose} + P_i \longrightarrow \text{glicose-6-fosfato} + H_2O \qquad \Delta G'^{\circ} = 13{,}8 \text{ kJ/mol}$$

O valor positivo de $\Delta G'^{\circ}$ indica que, em condições-padrão, a reação não tenderá a ocorrer espontaneamente no sentido representado. Outra reação celular, a hidrólise de ATP em ADP e $P_i$, é muito exergônica:

$$\text{ATP} + H_2O \rightarrow \text{ADP} + P_i \qquad \Delta G'^{\circ} = -30{,}5 \text{ kJ/mol}$$

Essas duas reações compartilham os intermediários comuns, $P_i$ e $H_2O$, e podem ser expressas como reações sequenciais:

| | |
|---|---|
| (1) | $\text{Glicose} + P_i \longrightarrow \text{glicose-6-fosfato} + H_2O$ |
| (2) | $\text{ATP} + H_2O \longrightarrow \text{ADP} + P_i$ |
| *Soma:* | $\text{ATP} + \text{glicose} \longrightarrow \text{ADP} + \text{glicose-6-fosfato}$ |

A variação de energia livre padrão global é obtida pelo somatório dos valores de $\Delta G'^{\circ}$ para as reações individuais:

$$\Delta G'^{\circ} = 13{,}8 \text{ kJ/mol} + (-30{,}5 \text{ kJ/mol}) = -16{,}7 \text{ kJ/mol}$$

A reação global é exergônica. Neste caso, a energia armazenada no ATP é utilizada para promover a síntese de glicose-6-fosfato, ainda que sua formação a partir de glicose e fosfato inorgânico ($P_i$) seja endergônica. A via de formação de glicose-6-fosfato a partir de glicose pela transferência de grupo fosforil do ATP é diferente das reações (1) e (2) descritas anteriormente, embora o resultado final seja equivalente ao somatório das duas reações. Nos cálculos termodinâmicos, tudo o que importa é o estado do sistema no início e no final do processo; o caminho entre os estados inicial e final é irrelevante.

Foi mencionado que $\Delta G'^{\circ}$ é uma forma de expressar a constante de equilíbrio para uma reação. Para a reação (1) anterior,

$$K'_{\text{eq}_1} = \frac{[\text{glicose-6-fosfato}]}{[\text{glicose}]\,[P_i]} = 3{,}9 \times 10^{-3}\ \text{M}^{-1}$$

Note que a $H_2O$ não está incluída nessa expressão, e assume-se que a sua concentração (55,5 M) mantém-se inalterada durante a reação. A constante de equilíbrio para a hidrólise de ATP é

$$K'_{\text{eq}_2} = \frac{[\text{ADP}]\,[P_i]}{[\text{ATP}]} = 2{,}0 \times 10^{5}\ \text{M}$$

Portanto, a constante de equilíbrio para as duas reações acopladas é

$$K'_{\text{eq}_3} = \frac{[\text{glicose-6-fosfato}]\,[\text{ADP}]\,[P_i]}{[\text{glicose}]\,[P_i]\,[\text{ATP}]}$$
$$= (K'_{\text{eq}_1})(K'_{\text{eq}_2}) = (3{,}9 \times 10^{-3}\ \text{M}^{-1})(2{,}0 \times 10^{5}\ \text{M})$$
$$= 7{,}8 \times 10^{2}$$

Este cálculo ilustra um ponto importante sobre as constantes de equilíbrio: embora os valores de $\Delta G'^{\circ}$ para duas reações cujo somatório resulte em uma terceira sejam *aditivos*, o $K'_{\text{eq}}$ para a reação global é o produto dos valores dos $K'_{\text{eq}}$ individuais das duas reações. As constantes de equilíbrio são *multiplicativas*. Devido ao acoplamento da hidrólise de ATP à síntese de glicose-6-fosfato, o $K'_{\text{eq}}$ para a formação de glicose-6-fosfato a partir de glicose aumenta na ordem de $2 \times 10^5$.

Esta estratégia envolvendo intermediários comuns é utilizada por todas as células vivas na síntese de intermediários metabólicos e de componentes celulares. Obviamente, a estratégia funciona apenas se compostos como o ATP estiverem continuamente disponíveis. Nos capítulos seguintes, serão consideradas algumas das mais importantes vias celulares para a produção de ATP.

### RESUMO 13.1 Bioenergética e termodinâmica

- As células vivas realizam trabalho constantemente. Elas necessitam de energia para manter suas estruturas altamente organizadas, sintetizar componentes celulares, gerar correntes elétricas e muitos outros processos.
- A bioenergética é o estudo quantitativo das relações de energia e conversões energéticas em sistemas biológicos. As transformações biológicas de energia obedecem às leis da termodinâmica.
- Todas as reações químicas são influenciadas por duas forças: a tendência de atingir o estado de ligação mais estável (para o qual a entalpia, $H$, é uma expressão útil) e a tendência de atingir o mais alto grau de desordem, expresso pela entropia, $S$. A força motriz líquida de uma reação é o $\Delta G$, a variação de energia livre, que representa o efeito líquido desses dois fatores: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.
- A variação de energia livre padrão aparente, $\Delta G'^{\circ}$, é uma constante física característica para uma dada reação e pode ser calculada a partir da constante de equilíbrio da reação: $\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{\text{eq}}$.
- A variação de energia livre real, $\Delta G$, é uma variável que depende de $\Delta G'^{\circ}$ e das concentrações dos reagentes e dos produtos: $\Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln([\text{produtos}]/[\text{reagentes}])$.
- Quando $\Delta G$ é elevado e negativo, a reação tende a seguir no sentido direto; quando $\Delta G$ é elevado e positivo, a reação tende a seguir no sentido inverso; quando $\Delta G$ = zero, o sistema está em equilíbrio.
- A variação de energia livre de uma reação é independente da via pela qual a reação ocorre. As variações de energia livre são aditivas; a reação química final resultante de sucessivas reações que compartilham intermediários comuns possui uma variação de energia livre global que é a soma dos valores de $\Delta G$ para as reações individuais.

## 13.2 Lógica química e reações bioquímicas comuns

As transduções biológicas de energia abordadas neste livro são reações químicas. A química celular não abrange todo tipo de reação estudada em um curso típico de química orgânica. Quais reações ocorrem em sistemas biológicos e quais não é algo determinado por (1) sua relevância para um sistema metabólico em particular e (2) sua velocidade. As duas considerações são importantes no formato das vias metabólicas que serão estudadas ao longo deste livro. Uma reação relevante é aquela que faz uso de um substrato disponível e o converte em um produto útil. No entanto, mesmo uma reação potencialmente relevante pode não ocorrer. Algumas transformações químicas são muito lentas (possuem energias de ativação muito altas) para contribuir com os sistemas vivos, mesmo com a ajuda de poderosos catalisadores enzimáticos. As reações que ocorrem nas células representam uma "caixa de ferramentas" que a evolução teria utilizado para construir as vias metabólicas que contornam as reações "impossíveis". Aprender a reconhecer as reações plausíveis pode ser uma ótima ajuda para desenvolver um conhecimento profundo em bioquímica.

Mesmo assim, o número de reações metabólicas que ocorrem em uma célula típica pode parecer exagerado. A maior parte das células tem a capacidade de realizar milhares de reações específicas, catalisadas por enzimas: por exemplo, a transformação de um nutriente simples como a glicose em aminoácidos, nucleotídeos ou lipídeos; a extração de energia a partir da oxidação de combustíveis; ou a polimerização de subunidades monoméricas em macromoléculas.

Para estudar essas reações, é essencial alguma organização. Existem padrões na química da vida; você não precisa estudar todas as reações individuais para compreender a lógica molecular da bioquímica. A maior parte das reações nas células vivas pertence a uma das cinco categorias gerais: (1) reações que criam ou quebram ligações carbono-carbono; (2) rearranjos internos, isomerizações e eliminações; (3) reações com radicais livres; (4) transferência de grupos; e (5) oxidação-redução. A seguir, cada uma dessas categorias será discutida em maior detalhe. Nos capítulos posteriores, serão citados alguns exemplos de cada tipo de reação. Note que os cinco tipos de reações não são mutuamente excludentes; por exemplo, uma reação de isomerização pode envolver um intermediário do tipo radical livre.

No entanto, antes de dar continuidade, é preciso revisar dois princípios químicos básicos. Primeiro, uma ligação covalente consiste em um par de elétrons compartilhados, e a ligação pode ser rompida, em geral, de duas formas (**Figura 13-1**). Na **clivagem homolítica**, cada átomo deixa a ligação na forma de um **radical**, carregando um elétron

**FIGURA 13-2 Nucleófilos e eletrófilos comuns em reações bioquímicas.** Os mecanismos de reações químicas, que descrevem a formação e a quebra de ligações covalentes, estão representados por pontos e setas curvas, uma convenção informalmente conhecida como "trajetória do elétron". Uma ligação covalente consiste em um par de elétrons compartilhado. Os elétrons importantes para o mecanismo da reação, que não participam da ligação, estão representados por pontos (:). As setas curvas (↷) representam o movimento do par de elétrons. Para o movimento de um único elétron (como em uma reação com radical livre), é usada uma seta de ponta única (tipo anzol) (⌒). A maioria dos passos da reação envolve um par de elétrons não compartilhado.

Clivagem homolítica

—C—H ⇌ —C• + •H

Radical de carbono | Átomo de H

—C—C— ⇌ —C• + •C—

Radicais de carbono

Clivagem heterolítica

—C—H ⇌ —C:⁻ + H⁺

Carbânion | Próton

—C—H ⇌ —C⁺ + H:⁻

Carbocátion | Hidreto

—C—C— ⇌ —C:⁻ + ⁺C—

Carbânion | Carbocátion

**FIGURA 13-1 Dois mecanismos para a clivagem de uma ligação C—C ou C—H.** Em uma clivagem homolítica, cada átomo mantém um dos elétrons da ligação, resultando na formação de radicais de carbono (carbonos contendo elétrons não pareados) ou átomos de hidrogênio não carregados. Em uma clivagem heterolítica, um dos átomos retém os dois elétrons da ligação. Isso pode resultar na formação de carbânions, carbocátions, prótons ou íons hidreto.

desemparelhado. Na **clivagem heterolítica**, que é a mais comum, um átomo retém os dois elétrons da ligação. As espécies mais frequentemente geradas quando as ligações C—C e C—H são clivadas estão ilustradas na Figura 13-1. Carbânions, carbocátions e íons hidreto são altamente instáveis; como será visto, essa instabilidade caracteriza a química desses íons.

O segundo princípio básico é que muitas reações bioquímicas envolvem interações entre **nucleófilos** (grupos funcionais ricos em elétrons e capazes de doá-los) e **eletrófilos** (grupos funcionais deficientes em elétrons e que os procuram). Os nucleófilos doam elétrons e combinam-se com os eletrófilos. Nucleófilos e eletrófilos comuns em biologia estão representados na **Figura 13-2**. Note que um átomo de carbono pode agir tanto como um nucleófilo quanto um eletrófilo, dependendo das ligações e dos grupos funcionais que o rodeiam.

**Reações que criam ou quebram ligações carbono-carbono.** A clivagem heterolítica de uma ligação C—C gera um **carbânion** e um **carbocátion** (Figura 13-1). Inversamente, a formação de uma ligação C—C envolve a combinação de um carbâ-

nion nucleofílico e um carbocátion eletrofílico. Carbânions e carbocátions geralmente são tão instáveis que a sua formação como intermediários de reação pode ser energeticamente inacessível, mesmo com catálise enzimática. Para a finalidade da bioquímica celular, essas reações impossíveis – a não ser que seja fornecido um auxílio químico na forma de grupos funcionais contendo átomos eletronegativos (O e N) que podem alterar a estrutura eletrônica dos átomos de carbonos adjacentes, de modo a estabilizar e facilitar a formação dos intermediários carbânion e carbocátion.

Os grupos carbonil são particularmente importantes nas transformações químicas das vias metabólicas. O átomo de carbono de um grupo carbonil possui uma carga positiva parcial devido à propriedade de retirar elétrons do oxigênio carbonílico, sendo portanto um carbono eletrofílico (**Figura 13-3a**). Um grupo carbonil pode então facilitar a formação de um carbânion em um carbono adjacente por deslocar as cargas negativas do carbânion (Figura 13-3b). Um grupo imino (ver Figura 1-16) pode ter uma função similar (Figura 13-3c). A capacidade de deslocar elétrons dos grupos carbonil e imino pode ainda ser potencializada por catálise ácida ou por um íon metálico, como o $Mg^{2+}$ (Figura 13-3d).

A importância do grupo carbonil é evidente nas três principais classes de reações em que ligações C—C são formadas ou quebradas (**Figura 13-4**): condensações aldólicas, condensação de Claisen e descarboxilações. Em cada tipo de reação, um intermediário carbânion é estabilizado por um grupo carbonil, e em muitos casos outro grupo carbonil fornece o eletrófilo com o qual o carbânion nucleofílico reage.

A **condensação aldólica** é uma rota comum para a formação de ligações C—C; a reação da aldolase na glicólise, que converte um composto de seis átomos de carbono em dois compostos de três átomos de carbono, é o inverso de uma condensação aldólica (ver Figura 14-6). Em uma **condensação de Claisen**, o carbânion é estabilizado pelo carbonil de um tioéster adjacente; um exemplo é a síntese de citrato no ciclo do ácido cítrico (ver Figura 16-9). A descarboxilação também envolve, geralmente, a geração de um carbânion estabilizado por um grupo carbonil; um exemplo é a reação da acetoacetato-descarboxilase, que leva à formação de corpos cetônicos durante o catabolismo dos ácidos graxos (ver Figura 17-19). Todas as vias metabólicas estão organizadas em torno da introdução de um grupo carbonil em uma localização particular, de modo que uma ligação carbono-carbono adjacente possa ser formada ou clivada. Em algumas reações, uma imina ou um cofator especializado, como piridoxal-fosfato, exerce a função de retirar elétrons do grupo carbonil.

O intermediário carbocátion que ocorre em algumas reações que formam ou clivam ligações C—C é gerado pela eliminação de um grupo de saída muito bom, como o pirofosfato (ver as reações de transferência de grupos, a seguir). Um exemplo é a reação da preniltransferase (**Figura 13-5**), uma etapa inicial na via de biossíntese do colesterol.

**Rearranjos internos, isomerizações e eliminações.** Outro tipo comum de reação celular é um rearranjo intramolecular em que a redistribuição de elétrons resulta em alterações de muitos tipos diferentes, sem alterar o estado de oxidação global da molécula. Por exemplo, grupos diferentes em uma molécula podem sofrer oxidação-redução, sem variar o estado líquido de oxidação da molécula; grupos contendo ligação dupla podem sofrer um rearranjo *cis-trans*; ou as posições das ligações duplas podem ser mudadas. Um exemplo de uma isomerização envolvendo oxidação-redução é a formação de frutose-6-fosfato a partir de glicose-6-

Condensação aldólica

Condensação de Claisen

Descarboxilação de um $\beta$-ceto ácido

**FIGURA 13-4 Algumas reações comuns de formação e quebra de ligações C—C em sistemas biológicos.** Tanto para a condensação aldólica como para a condensação de Claisen, um carbânion atua como nucleófilo e o carbono de um grupo carbonil atua como eletrófilo. O carbânion é estabilizado em cada caso por outro grupo carbonil no carbono adjacente ao carbânion. Na reação de descarboxilação, um carbânion é formado no carbono sombreado em azul quando o $CO_2$ é liberado. A reação não ocorreria em velocidade adequada sem o efeito estabilizador do carbonil adjacente ao carbânion. Em qualquer lugar em que um carbânion é mostrado, assume-se também a presença de uma ressonância estabilizadora com o carbonil adjacente, como representado na Figura 13-3b. Uma imina (Figura 13-3c) ou outro grupo removedor de elétrons (incluindo certos cofatores enzimáticos como o piridoxal) pode substituir o grupo carbonil na estabilização dos carbânions.

**FIGURA 13-3 Propriedades químicas do grupo carbonil. (a)** O átomo de carbono de um grupo carbonil é um eletrófilo devido à capacidade de retirar elétrons do átomo de oxigênio eletronegativo, resultando em uma estrutura em que o carbono tem carga positiva parcial. **(b)** No interior de uma molécula, o deslocamento dos elétrons para um grupo carbonil facilita e estabiliza a formação de um carbânion em um carbono adjacente. **(c)** As iminas atuam como os grupos carbonil, facilitando a retirada dos elétrons. **(d)** Os grupos carbonil não atuam sempre sozinhos; sua capacidade como escoadouro de elétrons frequentemente é potencializada pela interação com um íon metálico ($Me^{2+}$, como $Mg^{2+}$) ou com um ácido (HA).

Dimetilalil-pirofosfato

Isopentenil-pirofosfato

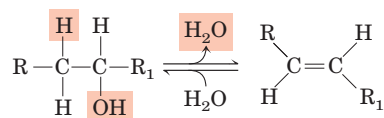
Carbocátion dimetil-alílico

Geranil-pirofosfato

**FIGURA 13-5 Os carbocátions na formação da ligação carbono-carbono.** Em uma das primeiras etapas da biossíntese do colesterol, a enzima preniltransferase catalisa a condensação de isopentenil-pirofosfato e dimetil-pirofosfato, formando geranil-pirofosfato (ver Figura 21-36). A reação é iniciada pela eliminação do pirofosfato do dimetil-pirofosfato para gerar um carbocátion, estabilizado por ressonância com a ligação C═C adjacente.

-fosfato na glicólise (**Figura 13-6**; esta reação é discutida em detalhes no Capítulo 14): C-1 é reduzido (aldeído para álcool) e C-2 é oxidado (álcool para cetona). A Figura 13-6b mostra os detalhes dos movimentos dos elétrons neste tipo de isomerização. Um rearranjo *cis-trans* está ilustrado na reação da prolil-*cis-trans*-isomerase no enovelamento de certas proteínas (ver Figura 4-8). Uma simples mudança de uma ligação C═C ocorre durante o metabolismo do ácido oleico, um ácido graxo comum (ver Figura 17-10). Alguns exemplos espetaculares de reposicionamento de duplas ligações ocorrem na biossíntese do colesterol (ver Figura 21-33).

Um exemplo de uma reação de eliminação que não afeta o estado de oxidação global é a perda de água por um álcool, resultando na introdução de uma ligação C═C:

$$R-CH_2-CH(OH)-R_1 \rightleftharpoons R(H)C{=}C(H)R_1 + H_2O$$

Reações similares podem resultar de eliminações em aminas.

**Reações envolvendo radicais livres.** Antigamente considerada rara, a clivagem homolítica de ligações covalentes com geração de radicais livres é, atualmente, encontrada em uma ampla gama de processos bioquímicos. Alguns exemplos são: isomerizações que fazem uso de adenosilcobalamina (vitamina $B_{12}$) ou *S*-adenosilmetionina, que são iniciadas com um radical 5′-desoxiadenosil (ver a reação da metilmalonil-CoA-mutase no Quadro 17-2); certas reações de descarboxilação iniciadas por radicais (**Figura 13-7**); algumas reações da redutase, como a catalisada pela ribonu-

(a)

Glicose-6-fosfato

Fosfoexose-isomerase

Frutose-6-fosfato

(b)

1. $B_1$ retira um próton.
2. Isso possibilita a formação de uma ligação dupla C═C.
3. Elétrons do grupo carbonil formam uma ligação O—H com o íon hidrogênio doado por $B_2$.
4. $B_2$ retira um próton, possibilitando a formação de uma ligação C═O.
5. Um par de elétrons é deslocado da ligação C═C para formar uma ligação C—H com o próton doado por $B_1$.

Intermediário enediol

**FIGURA 13-6 As reações de isomerização e eliminação. (a)** Conversão de glicose-6-fosfato a frutose-6-fosfato, reação do metabolismo de açúcares catalisada pela fosfoexose-isomerase. **(b)** Esta reação ocorre por meio de um intermediário enediol. Os quadros em cor salmão indicam a via de oxidação da esquerda para a direita. $B_1$ e $B_2$ são grupos ionizáveis da enzima; eles são capazes de doar e receber prótons (atuando como ácidos ou bases) à medida que a reação ocorre.

Coproporfirinogênio III — Radical coproporfirinogenil III — Protoporfirinogênio IX

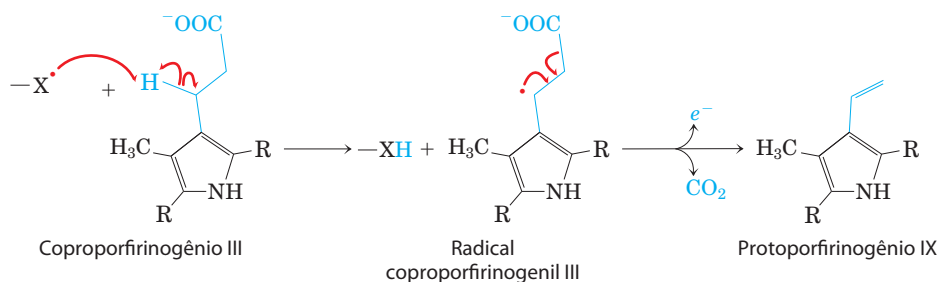
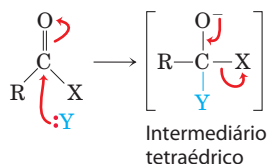



**FIGURA 13-7 Uma reação de descarboxilação iniciada por radicais livres.** A biossíntese do heme (ver Figura 22-26) em *Escherichia coli* inclui uma etapa de descarboxilação em que a cadeia lateral propionil do intermediário coproporfirinogênio III é convertida na cadeia lateral vinil do protoporfirinogênio IX. Quando a bactéria está crescendo anaerobiamente, a enzima independente de oxigênio coproporfirinogênio III-oxidase, também chamada de proteína HemN, promove a descarboxilação pelo mecanismo de radical livre mostrado aqui. O receptor do elétron liberado não é conhecido. Para simplificar, são mostradas apenas as porções relevantes das grandes moléculas de coproporfirinogênio III e protoporfirinogênio; as estruturas completas são mostradas na Figura 22-26. Quando *E. coli* está crescendo na presença de oxigênio, esta reação é uma descarboxilação oxidativa, sendo catalisada por uma enzima diferente.

cleotídeo-redutase (ver Figura 22-41); e algumas reações de rearranjo, como as catalisadas pela DNA-fotoliase (ver Figura 25-26).

**Reações de transferência de grupos.** A transferência de grupos acil, glicosil e fosforil de um nucleófilo para outro é comum em células vivas. A transferência de grupo acil geralmente envolve a adição de um nucleófilo ao carbono do carbonil de um grupo acil para formar um intermediário tetraédrico:

Intermediário tetraédrico

A reação da quimotripsina é um exemplo de transferência de grupo acil (ver Figura 6-22). A transferência de grupos glicosil envolve a substituição nucleofílica no C-1 do anel de um açúcar, que é o átomo central de um acetal. Em princípio, a substituição poderia prosseguir por via $S_N1$ ou $S_N2$, como descrito na Figura 6-28 para a enzima lisozima.

A transferência de grupos fosforil exerce função especial em vias metabólicas, e essas reações de transferência são discutidas em detalhes na Seção 13.3. Um tema geral no metabolismo é a ligação de um bom grupo de saída a um intermediário metabólico a fim de "ativá-lo" para as reações subsequentes. Entre os melhores grupos de saída em reações de substituição nucleofílica estão o ortofosfato inorgânico (a forma ionizada de $H_3PO_4$ em pH neutro, uma mistura de $H_2PO_4^-$ e $HPO_4^{2-}$, geralmente abreviado como $P_i$) e o pirofosfato inorgânico ($P_2O_7^{4-}$, abreviado como $PP_i$); os ésteres e os anidridos do ácido fosfórico são efetivamente ativados para reação. A substituição nucleofílica torna-se mais favorável pela ligação de um grupo fosforil a um grupo de saída pobre, como o hidroxil —OH. As substituições nucleofílicas, nas quais o grupo fosforil (—$PO_3^{2-}$) atua como um grupo de saída, ocorrem em centenas de reações metabólicas.

O fósforo pode formar cinco ligações covalentes. A representação convencional de $P_i$ (**Figura 13-8a**), com três

(a)

(b)

(c) Adenina — Ribose — ATP — Glicose

Adenina — Ribose — ADP + Glicose-6-fosfato, um éster-fosfato

(d)

Z = R—OH
W = ADP

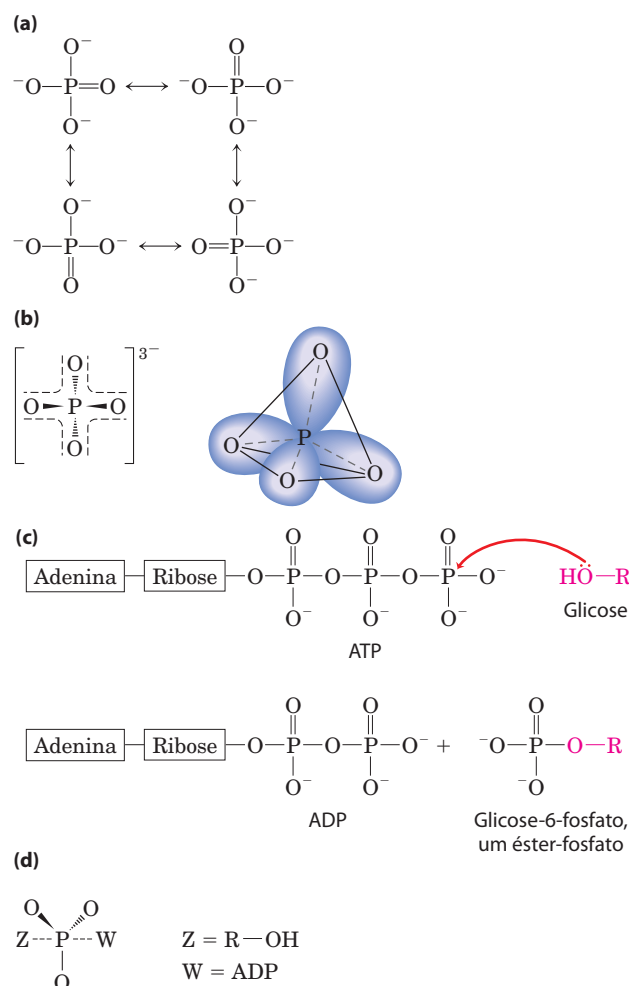



**FIGURA 13-8 Transferência de grupos fosforil: alguns dos participantes. (a)** Em uma representação (inadequada) de $P_i$, três oxigênios estão ligados ao fósforo por ligações simples, e o quarto está ligado por ligação dupla, possibilitando as quatro estruturas de ressonância diferentes mostradas aqui. **(b)** As estruturas de ressonância de $P_i$ podem ser representadas mais acuradamente mostrando todas as quatro ligações fósforo-oxigênio com caráter de ligação dupla parcial; os orbitais híbridos assim representados estão arranjados em um tetraedro com o P na posição central. **(c)** Quando um nucleófilo Z (neste caso, a —OH do C-6 da glicose) ataca o ATP, ele desloca ADP (W). Nesta reação $S_N2$, um intermediário pentacovalente **(d)** é formado transitoriamente.

ligações P—O e uma ligação P═O, é conveniente, mas não é acurada. No $P_i$, quatro ligações fósforo-oxigênio equivalentes compartilham parcialmente o caráter de ligação dupla, e o ânion tem uma estrutura tetraédrica (Figura 13-8b). Como o oxigênio é mais eletronegativo que o fósforo, o compartilhamento dos elétrons é desigual: o fósforo central fica com uma carga positiva parcial e, portanto, atua como um eletrófilo. Em um número muito grande de reações metabólicas, um grupo fosforil (—$PO_3^{2-}$) é transferido do ATP para um álcool, formando um éster fosfato (Figura 13-8c), ou para um ácido carboxílico, formando um anidrido misto. Quando um nucleófilo ataca o átomo de fósforo eletrofílico do ATP, forma-se um intermediário de reação com uma estrutura pentacovalente relativamente estável (Figura 13-8d). Com a partida do grupo de saída (ADP), a transferência de um grupo fosforil está completa. A grande família de enzimas que catalisam a transferência de grupos fosforil, com o ATP como doador, é chamada de **cinase** (do grego, *kinein*, "mover"). A hexocinase, por exemplo, "move" um grupo fosforil do ATP para a glicose.

Os grupos fosforil não são os únicos grupos que ativam moléculas para reação. Os tioálcoois (tióis), em que o átomo de oxigênio de um álcool é substituído por um átomo de enxofre, também são bons grupos de saída. Os tióis ativam os ácidos carboxílicos pela formação de tioésteres (ou tiol ésteres). Em capítulos posteriores serão discutidas diversas reações, inclusive aquelas catalisadas pela acil graxo-sintetase na síntese de lipídeos (ver Figura 21-2), em que a substituição nucleofílica no carbono do carbonil de um tioéster resulta na transferência do grupo acil para outra região.

**Reações de oxidação-redução.** Os átomos de carbono podem existir em cinco estados de oxidação, dependendo dos elementos com que eles compartilham os elétrons (**Figura 13-9**), e as transições entre esses estados de oxidação são de importância crucial no metabolismo (as reações de oxidação-redução são o tópico da Seção 13.4). Em muitas oxidações biológicas, um composto perde dois elétrons e dois íons hidrogênio (ou seja, dois átomos de hidrogênio); essas reações são comumente chamadas de desidrogenações, e as enzimas que as catalisam são chamadas de desidrogenases (**Figura 13-10**). Em algumas oxidações biológicas, mas não em todas, um átomo de carbono é covalentemente ligado a um átomo de oxigênio. As enzimas que catalisam essas oxidações geralmente são chamadas de oxidases ou, se o átomo de oxigênio é derivado diretamente de um oxigênio molecular ($O_2$), oxigenases.

Cada oxidação deve ser acompanhada por uma redução, em que um receptor de elétrons recebe os elétrons removidos na oxidação. As reações de oxidação geralmente liberam energia (pense em uma fogueira: os compostos na madeira são oxidados por moléculas de oxigênio do ar). A maioria das células vivas obtém energia necessária para o trabalho celular pela oxidação de combustíveis metabólicos como carboidratos ou gorduras (os organismos fotossintéticos também podem captar e usar a energia da luz solar). As vias catabólicas (que liberam energia) descritas nos Capítulos 14 a 19 são sequências de reações oxidativas que resultam na transferência de elétrons das moléculas combustíveis para o oxigênio por meio de uma série de transportadores de elétrons. A alta afinidade do $O_2$ por elétrons torna o processo global de transferência de elétrons altamente exergônico, fornecendo energia que leva à síntese de ATP – o objetivo central do catabolismo.

Muitas das reações dessas cinco classes são facilitadas por cofatores, na forma de coenzimas e metais (vitamina $B_{12}$, *S*-adenosilmetionina, folato, nicotinamida e ferro são alguns exemplos). Os cofatores ligam-se às enzimas – em alguns casos reversivelmente, em outros casos quase irreversivelmente – e conferem a elas a capacidade de promover um tipo particular de reação química (p. 190). A maior parte dos cofatores participa em uma estreita faixa de reações diretamente relacionadas. Os capítulos seguintes apresentam e discutem cada cofator biologicamente importante. Os cofatores fornecem outra forma de organizar o estudo dos processos bioquímicos, já que as reações facilitadas por um determinado cofator costumam ser mecanisticamente relacionadas.

$—CH_2—CH_3$ Alcano
$—CH_2—CH_2OH$ Álcool
$—CH_2—C(=O)H(R)$ Aldeído (cetona)
$—CH_2—C(=O)OH$ Ácido carboxílico
O═C═O Dióxido de carbono

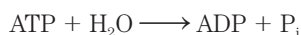
**FIGURA 13-9 Os níveis de oxidação do carbono em biomoléculas.** Cada composto é formado por oxidação do carbono em vermelho no composto mostrado imediatamente acima. O dióxido de carbono é a forma de carbono mais altamente oxidado encontrada em sistemas vivos.

$CH_3—CH(OH)—COO^-$ ⇌ $CH_3—C(=O)—COO^-$ ($2H^+ + 2e^-$)
Lactato — Lactato-desidrogenase — Piruvato

**FIGURA 13-10 Uma reação de oxidação-redução.** Está representada aqui a oxidação do lactato a piruvato. Nesta desidrogenação, dois elétrons e dois íons hidrogênio (o equivalente a dois átomos de hidrogênio) são removidos do C-2 do lactato, um álcool, formando piruvato, uma cetona. Nas células, a reação é catalisada pela lactato-desidrogenase, e os elétrons são transferidos para o cofator dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (NAD). Esta reação é totalmente reversível; o piruvato pode ser reduzido pela transferência dos elétrons do cofator.

## As equações bioquímicas e químicas não são idênticas

Os bioquímicos representam as equações metabólicas de forma simplificada, e isso é particularmente evidente para as reações envolvendo ATP. Os compostos fosforilados podem existir em vários estados de ionização e, conforme já mencionado, as diferentes espécies podem ligar $Mg^{2+}$. Por exemplo, em pH 7,0 e 2 mM de $Mg^{2+}$, o ATP existe na forma de $ATP^{4-}$, $HATP^{3-}$, $H_2ATP^{2-}$, $MgHATP^-$ e $Mg_2ATP$. Considerando a função biológica do ATP, no entanto, nem sempre há interesse em todos esses detalhes e, assim, considera-se o ATP como uma entidade constituída pela soma dessas espécies e representa-se sua hidrólise como a equação bioquímica

$$ATP + H_2O \longrightarrow ADP + P_i$$

na qual ATP, ADP e $P_i$ correspondem ao somatório das espécies. A constante de equilíbrio padrão aparente correspondente, $K'_{eq}$ = [ADP][$P_i$]/[ATP], depende do pH e da concentração de $Mg^{2+}$ livre. Note que $H^+$ e $Mg^{2+}$ não aparecem na equação bioquímica, pois são mantidos constantes. Portanto, uma equação bioquímica não inclui necessariamente o equilíbrio de H, Mg ou de cargas, embora ela inclua o equilíbrio entre todos os outros elementos envolvidos na reação (C, N, O e P na equação acima).

É possível escrever uma equação química que *inclui* o equilíbrio de todos os elementos e cargas. Por exemplo, quando o ATP é hidrolisado em valores de pH acima de 8,5 na ausência de $Mg^{2+}$, a reação química é representada por

$$ATP^{4-} + H_2O \rightarrow ADP^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+$$

A constante de equilíbrio correspondente, $K'_{eq}$ = [$ADP^{3-}$][$HPO_4^{2-}$][$H^+$]/[$ATP^{4-}$], depende apenas da temperatura, da pressão e da força iônica.

As duas formas de representar uma reação metabólica são relevantes em bioquímica. As equações químicas são utilizadas quando se quer levar em consideração todos os átomos e cargas em uma reação, como quando se estuda o mecanismo de uma reação química. As equações bioquímicas são utilizadas para determinar em qual sentido uma reação ocorrerá espontaneamente, dado um valor de pH e [$Mg^{2+}$] específicos, ou para calcular a constante de equilíbrio da reação.

Ao longo deste livro serão utilizadas equações bioquímicas, a não ser quando o foco for o mecanismo químico envolvido, sendo utilizados os valores de $\Delta G'^{\circ}$ e $K'_{eq}$ determinados em pH 7 e 1 mM de $Mg^{2+}$.

### RESUMO 13.2 Lógica química e reações bioquímicas comuns

- Os sistemas vivos fazem uso de um grande número de reações químicas que podem ser classificadas em cinco tipos gerais.
- Os grupos carbonil exercem função especial nas reações que formam ou clivam ligações C—C. Os intermediários carbânions são comuns e estabilizados por grupos carbonil adjacentes ou, menos frequentemente, por grupos imino e certos cofatores.
- A redistribuição dos elétrons pode produzir rearranjos internos, isomerizações e eliminações. Essas reações incluem oxidação-redução intramolecular, alteração do arranjo *cis-trans* de ligações duplas e transposições de ligações duplas.
- A clivagem homolítica de ligações covalentes com a geração de radicais livres ocorre em algumas vias, como em certas reações de isomerização, descarboxilação, redutase e rearranjos.
- As reações de transferência de grupos fosforil são um tipo especialmente importante de transferência de grupos nas células, necessário para a ativação de moléculas para as reações que de outra forma seriam altamente desfavoráveis.
- As reações de oxidação-redução envolvem a perda ou o ganho de elétrons: um reagente ganha elétrons e é reduzido, enquanto outro perde elétrons e é oxidado. As reações de oxidação geralmente liberam energia e são importantes no catabolismo.

## 13.3 Transferência de grupos fosforil e ATP

Uma vez tendo sido apresentados alguns princípios fundamentais da variação de energia em sistemas químicos, sendo revisadas as classes comuns de reações, agora é possível examinar o ciclo de energia nas células e a função especial do ATP como a moeda energética que relaciona catabolismo e anabolismo (ver Figura 1-29). As células heterotróficas obtêm energia livre de forma química pelo catabolismo de moléculas de nutrientes, e elas usam essa energia para fazer ATP a partir de ADP e $P_i$. O ATP, então, doa parte da sua energia química para processos endergônicos como a síntese de intermediários metabólicos e de macromoléculas a partir de precursores menores, para o transporte de substâncias por meio de membranas contra gradientes de concentração, e para o movimento mecânico. Essa doação de energia do ATP geralmente envolve a sua participação covalente na reação, com a eventual conversão de ATP em ADP e $P_i$, ou, em algumas reações, em AMP e 2 $P_i$. Serão discutidas aqui as bases químicas para a grande variação de energia livre que acompanha a hidrólise de ATP e de outros compostos de fosfato altamente energéticos, e será mostrado que a maior parte dos casos de doação de energia por ATP envolve a transferência de grupo, e não simplesmente a hidrólise de ATP. Para ilustrar a gama de transduções de energia em que o ATP fornece a energia, será abordada a síntese de macromoléculas ricas em informação, o transporte de solutos através das membranas e o movimento produzido pela contração muscular.

$$ATP^{4-} + H_2O \longrightarrow ADP^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+$$
$$\Delta G'^{\circ} = -30{,}5 \text{ kJ/mol}$$

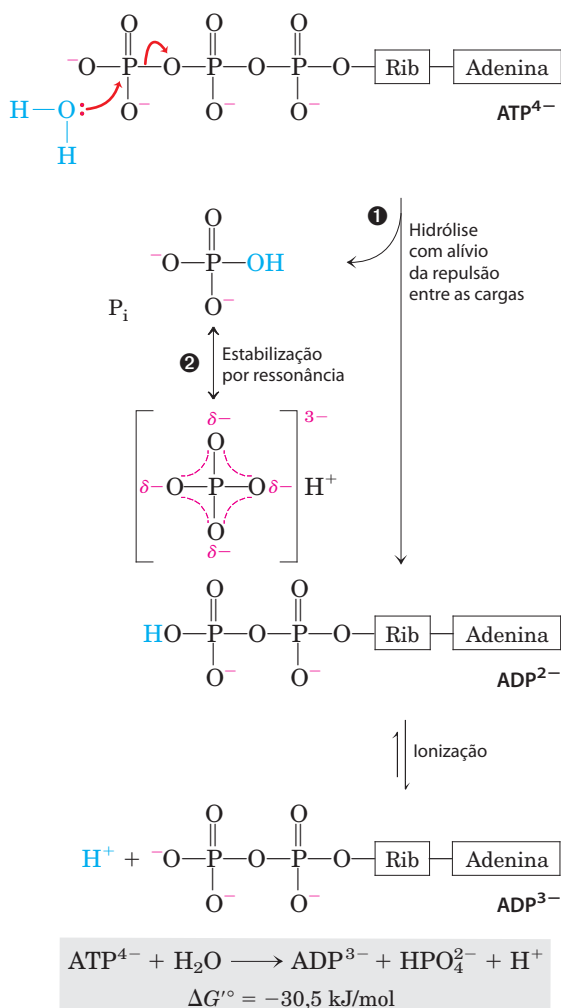



**FIGURA 13-11 Bases químicas para a grande variação de energia livre associada à hidrólise de ATP.** ❶ A separação de cargas resultante da hidrólise atenua a repulsão eletrostática entre as quatro cargas negativas do ATP. ❷ O fosfato inorgânico liberado ($P_i$) é estabilizado pela formação de um híbrido de ressonância, em que cada uma das quatro ligações fósforo-oxigênio apresenta o mesmo grau do caráter de ligação dupla e os íons hidrogênio não se encontram permanentemente associados a nenhum dos átomos de oxigênio. (Certo grau de estabilização por ressonância também ocorre nos fosfatos envolvidos nas ligações éster ou anidrido, mas em menor quantidade que no $P_i$.). Um terceiro fator (não mostrado) que favorece a hidrólise de ATP é o maior grau de solvatação (hidratação) dos produtos $P_i$ e ADP em relação ao ATP, que proporciona uma estabilização adicional dos produtos em relação aos reagentes.

## A variação de energia livre para a hidrólise do ATP é grande e negativa

A **Figura 13-11** resume as bases químicas da energia livre padrão da hidrólise de ATP, relativamente grande e negativa. A hidrólise da ligação do anidrido do ácido fosfórico (fosfoanidrido) terminal do ATP separa um dos três fosfatos negativamente carregados, aliviando assim parte da repulsão eletrostática no ATP; o $P_i$ liberado é estabilizado pela geração de formas de ressonância que não são possíveis no ATP.

A variação de energia livre para hidrólise de ATP é −30,5 kJ/mol em condições padrão, mas a energia livre *real* da hidrólise do ATP ($\Delta G$) em células vivas é muito diferente: as concentrações celulares de ATP, ADP e $P_i$ não são idênticas e são muito mais baixas do que 1,0 M das condições-padrão (Tabela 13-5). Além disso, o $Mg^{2+}$ no citosol liga ATP e ADP (**Figura 13-12**), e, para a maioria das reações enzimáticas que envolve ATP como doador de grupo fosforil, o verdadeiro substrato é $MgATP^{2-}$. O $\Delta G'^{\circ}$ relevante é, portanto, aquele da hidrólise de $MgATP^{2-}$. Pode-se calcular o $\Delta G$ para a hidrólise de ATP usando os dados da Tabela 13-5. A energia livre real para a hidrólise de ATP em condições intracelulares frequentemente é chamada de **potencial de fosforilação**, $\Delta G_p$.

**TABELA 13-5** Concentrações de nucleotídeos de adenina, fosfato inorgânico e fosfocreatina em algumas células

| | Concentração (mM)* | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ATP | ADP** | AMP | $P_i$ | PCr |
| Hepatócito de rato | 3,38 | 1,32 | 0,29 | 4,8 | 0 |
| Miócito de rato | 8,05 | 0,93 | 0,04 | 8,05 | 28 |
| Neurônio de rato | 2,59 | 0,73 | 0,06 | 2,72 | 4,7 |
| Eritrócito humano | 2,25 | 0,25 | 0,02 | 1,65 | 0 |
| *E. coli* | 7,90 | 1,04 | 0,82 | 7,9 | 0 |

*Para os eritrócitos, as concentrações são aquelas do citosol (eritrócitos humanos não possuem núcleo e mitocôndria). Nos outros tipos celulares, os dados são para o conteúdo total da célula, embora o citosol e a mitocôndria possuam concentrações muito diferentes de ADP. PCR é fosfocreatina, discutida na p. 526.
**Este valor reflete a concentração total; o valor real de ADP livre deve ser muito menor (p. 519).

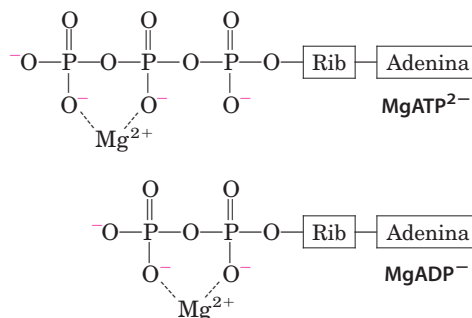



**FIGURA 13-12 $Mg^{2+}$ e ATP.** A formação dos complexos com o $Mg^{2+}$ isola parcialmente as cargas negativas e influencia a conformação dos grupos fosfato em nucleotídeos como ATP e ADP.

**PROBLEMA RESOLVIDO 13-2** **Cálculo do $\Delta G_p$**

Calcule a energia livre real para a hidrólise de ATP, $\Delta G_p$, em eritrócitos humanos. A energia livre padrão para a hidrólise do ATP é −30,5 kJ/mol, e as concentrações de ATP, ADP e $P_i$ em eritrócitos estão mostradas na Tabela 13-5. Assuma que o pH é 7,0 e a temperatura é 37°C (temperatura corporal). O que isso revela sobre a quantidade de energia necessária para *sintetizar* ATP sob as mesmas condições celulares?

**Solução:** As concentrações de ATP, ADP e $P_i$ em eritrócitos humanos são de 2,25, 0,25 e 1,65 mM, respectivamente. A energia livre real para a hidrólise do ATP sob essas condições é dada pela relação (ver Equação 13-4)

$$\Delta G_p = \Delta G'^\circ + RT \ln \frac{[\text{ADP}][\text{P}_i]}{[\text{ATP}]}$$

Substituindo os valores apropriados, obtém-se

$$\begin{aligned} \Delta G_p &= -30{,}5 \text{ kJ/mol} + \left[ (8{,}315 \text{ J/mol} \cdot \text{K})(310 \text{ K}) \ln \frac{(0{,}25 \times 10^{-3})(1{,}65 \times 10^{-3})}{(2{,}25 \times 10^{-3})} \right] \\ &= -30{,}5 \text{ kJ/mol} + (2{,}58 \text{ kJ/mol}) \ln 1{,}8 \times 10^{-4} \\ &= -30{,}5 \text{ kJ/mol} + (2{,}58 \text{ kJ/mol})(-8{,}6) \\ &= -30{,}5 \text{ kJ/mol} - 22 \text{ kJ/mol} \\ &= -52 \text{ kJ/mol} \end{aligned}$$

(Note que a resposta final foi arredondada para o número correto de dígitos significativos [52,5 arredondado para 52], de acordo com regras de arredondamento de números que terminam em 5 para o dígito inferior mais próximo.) Assim, a variação de energia livre real, $\Delta G_p$, para hidrólise de ATP em eritrócitos intactos (−52 kJ/mol) é muito maior do que a variação de energia livre padrão (−30,5 kJ/mol). Da mesma forma, a energia livre necessária para *sintetizar* ATP a partir de ADP e $P_i$, sob as condições que prevalecem nos eritrócitos, seria de 52 kJ/mol.

Como as concentrações de ATP, ADP e $P_i$ diferem de um tipo de célula para a outra, os valores de $\Delta G_p$ para a hidrólise do ATP também são diferentes. Além disso, em uma célula específica, $\Delta G_p$ pode variar com o tempo, dependendo das condições metabólicas da célula e de como elas interferem nas concentrações de ATP, ADP, $P_i$ e $H^+$ (pH). É possível calcular a variação de energia livre real para qualquer reação metabólica, nas condições em que ela ocorre na célula, desde que sejam conhecidas as concentrações de todos os reagentes e produtos da reação, além de outros fatores (como pH, temperatura e $[Mg^{2+}]$) que podem afetar a variação de energia livre real.

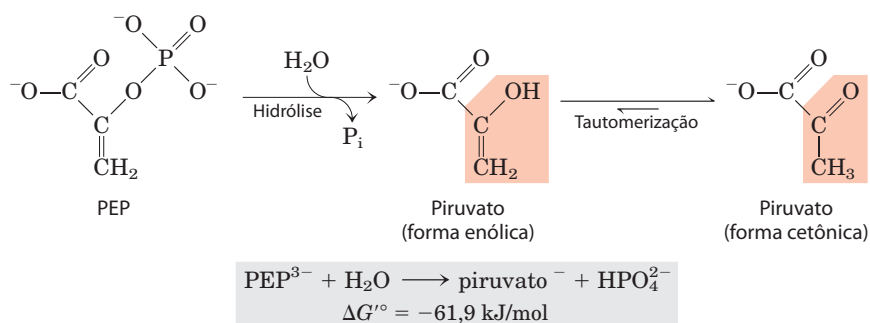
Para complicar ainda mais o assunto, as concentrações *totais* de ATP, ADP, $P_i$ e $H^+$ em uma célula podem ser substancialmente maiores que as concentrações *livres*, que são os valores termodinamicamente relevantes. A diferença se deve à ligação forte de ATP, ADP e $P_i$ a proteínas celulares. Por exemplo, a [ADP] livre no músculo em repouso tem sido alternadamente estimada entre 1 e 37 $\mu$M. Utilizando o valor de 25 $\mu$M do Problema Resolvido 13-2, obter-se-ia um valor de $\Delta G_p$ de −64 kJ/mol. O cálculo do valor exato de $\Delta G_p$, no entanto, talvez seja menos instrutivo do que a possível generalização sobre as variações de energia livre real: *in vivo*, a energia liberada pela hidrólise do ATP é maior do que a variação de energia livre padrão, $\Delta G'^\circ$.

Nas discussões seguintes será usado o valor de $\Delta G'^\circ$ para a hidrólise de ATP, já que esse valor permite a comparação, na mesma base, com os valores energéticos de outras reações celulares. No entanto, sempre tenha em mente que em células vivas o $\Delta G$ é a quantidade relevante – para a hidrólise do ATP e todas as outras reações – e pode ser bem diferente do $\Delta G'^\circ$.

Agora, é preciso fazer uma observação importante sobre os níveis de ATP. É mostrado (e discutido adiante) como as propriedades químicas do ATP o tornam uma forma conveniente de moeda de energia nas células. Contudo, não são meramente as propriedades químicas intrínsecas da molécula que dão ao ATP essa capacidade de direcionar as reações metabólicas e outros processos que requerem energia. Ainda mais importante é que, ao longo da evolução, ocorreu uma pressão de seleção muito forte a favor de mecanismos regulatórios que *mantenham as concentrações de ATP muito abaixo das concentrações de equilíbrio* da reação de hidrólise. Quando o nível de ATP diminui, não apenas a *quantidade* de combustível diminui, mas o combustível por si só *perde seu potencial*: o $\Delta G$ da sua hidrólise (ou seja, seu potencial de fosforilação, $\Delta G_p$) está diminuído. Como as discussões sobre as vias metabólicas que produzem e consomem ATP mostrarão, as células vivas desenvolveram mecanismos elaborados – o que frequentemente pode nos parecer à custa de eficiência e de bom senso – para manter altas concentrações de ATP.

**FIGURA 13-13 Hidrólise do fosfoenolpiruvato (PEP).** Catalisada pela piruvato-cinase, esta reação é seguida pela tautomerização espontânea do produto, o piruvato. A tautomerização não é possível no PEP e, assim, os produtos da hidrólise são estabilizados em relação aos reagentes. Também ocorre a estabilização por ressonância do $P_i$, como mostrado na Figura 13-11.

PEP — Hidrólise ($H_2O$ → $P_i$) — Piruvato (forma enólica) — Tautomerização — Piruvato (forma cetônica)

$$PEP^{3-} + H_2O \longrightarrow \text{piruvato}^{-} + HPO_4^{2-}$$
$$\Delta G'^{\circ} = -61{,}9 \text{ kJ/mol}$$

## Outros compostos fosforilados e tioésteres também apresentam energia livre de hidrólise elevada

O fosfoenolpiruvato (PEP; **Figura 13-13**) contém uma ligação éster-fosfato que sofre hidrólise para gerar a forma enólica do piruvato, e esse produto direto pode tautomerizar-se gerando a forma cetônica mais estável. Como o reagente (PEP) tem apenas uma forma (enol) e o produto (piruvato) contém duas formas possíveis, o produto é estabilizado em relação ao reagente. Este é o fator que mais contribui para a elevada energia livre padrão de hidrólise do fosfoenolpiruvato: $\Delta G'^{\circ} = -61{,}9$ kJ/mol.

Outro composto de três átomos de carbono, o 1,3-bifosfoglicerato (**Figura 13-14**), tem uma ligação anidrido entre o C-1 do grupo carboxil e um ácido fosfórico. A hidrólise desse acil-fosfato é acompanhada por uma variação de energia livre elevada e negativa ($\Delta G'^{\circ} = -49{,}3$ kJ/mol) que pode, mais uma vez, ser explicada nos termos da estrutura dos reagentes e produtos. Quando $H_2O$ é adicionada à ligação anidrido do 1,3-bifosfoglicerato, um dos produtos diretos, o ácido-3-fosfoglicérico, pode perder um próton gerando um íon carboxilato, o 3-fosfoglicerato, o qual contém duas formas de ressonância igualmente prováveis (Figura 13-14). A remoção do produto direto (ácido-3-fosfoglicérico) e a formação do íon estabilizado por ressonância favorecem a reação no sentido direto.

Na fosfocreatina (**Figura 13-15**), a ligação P—N pode ser hidrolisada para gerar creatina livre e $P_i$. A liberação de $P_i$ e a estabilização por ressonância da creatina favorecem a reação no sentido direto. A variação de energia livre padrão da hidrólise da fosfocreatina também é elevada, −43,0 kJ/mol.

Em todas essas reações em que ocorre a liberação de fosfato, as várias formas de ressonância disponíveis para o $P_i$ (Figura 13-11) estabilizam esse produto em relação ao reagente, contribuindo para uma variação de energia livre

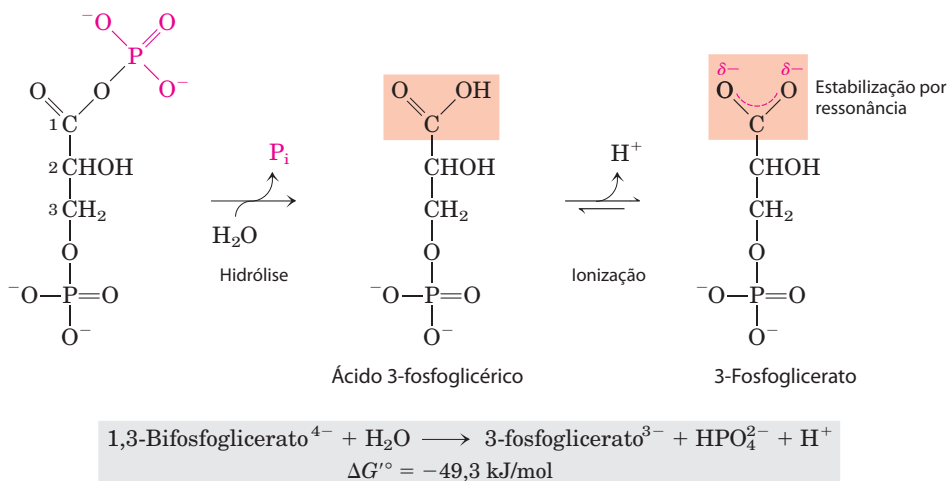



**FIGURA 13-14 Hidrólise do 1,3-bifosfoglicerato.** O produto direto da hidrólise do 1,3-bifosfoglicerato é o ácido 3-fosfoglicérico, o qual apresenta um grupo ácido carboxílico não dissociado. Sua dissociação favorece as estruturas de ressonância que estabilizam o produto, em relação aos reagentes. A estabilização por ressonância do $P_i$ representa uma contribuição adicional à variação de energia livre negativa.

Hidrólise ($H_2O$ → $P_i$) — Ácido 3-fosfoglicérico — Ionização ($H^+$) — 3-Fosfoglicerato (Estabilização por ressonância)

$$1{,}3\text{-Bifosfoglicerato}^{4-} + H_2O \longrightarrow 3\text{-fosfoglicerato}^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+$$
$$\Delta G'^{\circ} = -49{,}3 \text{ kJ/mol}$$

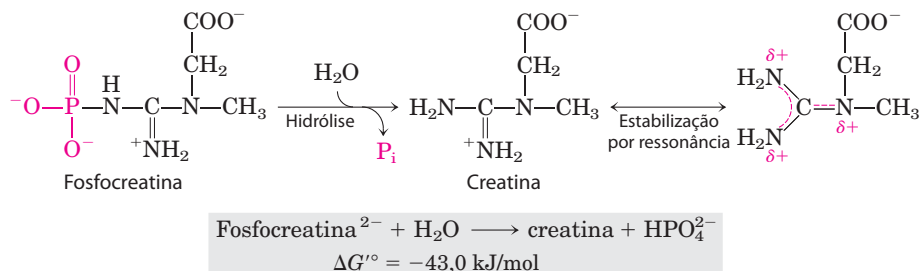



**FIGURA 13-15 Hidrólise da fosfocreatina.** A quebra da ligação P—N da fosfocreatina gera creatina, a qual é estabilizada pela formação de um híbrido de ressonância. O outro produto, o $P_i$, também é estabilizado por ressonância.

Fosfocreatina — Hidrólise ($H_2O$ → $P_i$) — Creatina — Estabilização por ressonância

$$\text{Fosfocreatina}^{2-} + H_2O \longrightarrow \text{creatina} + HPO_4^{2-}$$
$$\Delta G'^{\circ} = -43{,}0 \text{ kJ/mol}$$

**TABELA 13-6** Valores de energia livre padrão de hidrólise de alguns compostos fosforilados e da acetil-CoA (um tioéster)

| | $\Delta G'°$ | |
|---|---|---|
| | (kJ/mol) | (kcal/mol) |
| Fosfoenolpiruvato 1,3-bifosfoglicerato | −61,9 | −14,8 |
| 1,3-Bifosfoglicerato (→3-fosfoglicerato + $P_i$) | −49,3 | −11,8 |
| Fosfocreatina | −43,0 | −10,3 |
| ADP (→ AMP + $P_i$) | −32,8 | −7,8 |
| ATP (→ ADP + $P_i$) | −30,5 | −7,3 |
| ATP (→ AMP + $PP_i$) | −45,6 | −10,9 |
| AMP (→ adenosina + $P_i$) | −14,2 | −3,4 |
| $PP_i$ (→ 2$P_i$) | −19,2 | −4,0 |
| Glicose-3-fosfato | −20,9 | −5,0 |
| Frutose-6-fosfato | −15,9 | −3,8 |
| Glicose-6-fosfato | −13,8 | −3,3 |
| Glicerol-3-fosfato | −9,2 | −2,2 |
| Acetil-CoA | −31,4 | −7,5 |

Fonte: Dados extraídos, na maior parte, de Jencks, W. P. (1976), *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology,* 3rd ed. (Fasman, G.D., ed., *Physical and Chemical Data*, vol. 1, p. 296-304, CRC Press, Boca Raton, FL. O valor da energia livre para a hidrólise de $PP_i$ foi extraído de Frey, P.A. & Arabshahi, A. (1995) Standard free-energy change for the hydrolysis of the $\alpha$-$\beta$-phosphoanhydride in ATP. *Biochemistry* **34**, 11, 307-11, 310.

negativa. A Tabela 13-6 apresenta a energia livre padrão de hidrólise para alguns compostos fosforilados de importância biológica.

Os **tioésteres**, em que um átomo de enxofre substitui o oxigênio na ligação éster, também têm energia livre padrão de hidrólise elevada e negativa. A acetil-coenzima A, ou acetil-CoA (**Figura 13-16**), é um dos muitos tioésteres importantes no metabolismo. O grupo acil nesses compostos é ativado por reações de transacilação, condensação ou oxidação-redução. Os tioésteres sofrem muito menos estabilização por ressonância do que os ésteres de oxigênio; consequentemente, a diferença de energia

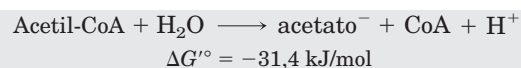
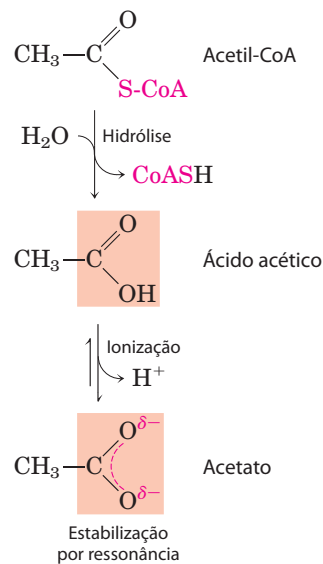



**FIGURA 13-16 Hidrólise da acetil-coenzima A.** A acetil-CoA é um tioéster com energia livre padrão de hidrólise elevada e negativa. Os tioésteres contêm um átomo de enxofre na posição ocupada por um átomo de oxigênio nos ésteres. A estrutura completa da coenzima A (CoA ou CoASH) está representada na Figura 8-38.

livre entre o reagente e os seus produtos de hidrólise que *são* estabilizados por ressonância é maior para os tioésteres do que para os ésteres de oxigênio relacionados (**Figura 13-17**). Em ambos os casos, a hidrólise do éster gera um ácido carboxílico que pode ionizar e assumir vários estados de ressonância. Somados, esses fatores resultam em um ΔG'° de hidrólise da acetil-CoA (−31,4 kJ/mol) elevado e negativo.

Em resumo, para as reações de hidrólise com variações de energia livre padrão elevadas e negativas, os produtos são mais estáveis do que os reagentes por uma, ou mais, das seguintes razões: (1) a tensão de ligação dos reagentes devido à repulsão eletrostática é aliviada pela separação de cargas, como para o ATP; (2) os produtos são estabilizados por ionização, como no ATP, nos acil-fosfatos e nos tioés-

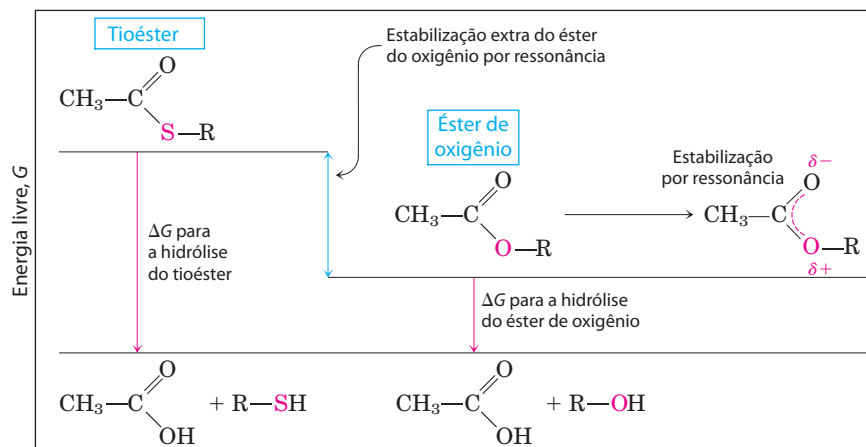



**FIGURA 13-17 Energia livre de hidrólise para tioésteres e ésteres de oxigênio.** Os *produtos* de ambos os tipos de reação de hidrólise têm aproximadamente o mesmo conteúdo de energia livre (*G*), mas o tioéster tem conteúdo de energia livre maior que o éster de oxigênio. A sobreposição de orbitais entre os átomos de O e C possibilita a estabilização por ressonância dos ésteres de oxigênio; a sobreposição de orbitais entre os átomos de S e C é pouco expressiva e gera pouca estabilização por ressonância.

teres; (3) os produtos são estabilizados por isomerização (tautomerização), como para o PEP; e/ou (4) os produtos são estabilizados por ressonância, como para a creatina liberada da fosfocreatina, o íon carboxilato liberado do acil-fosfato e dos tioésteres, e o fosfato ($P_i$) liberado das ligações anidrido ou éster.

## O ATP fornece energia por transferência de grupos e não por simples hidrólise

Ao longo deste livro você encontrará reações ou processos para os quais o ATP fornece energia. A contribuição do ATP para essas reações é comumente indicada como na **Figura 13-18a**, com uma seta simples mostrando a conversão de ATP em ADP e $P_i$ (ou, em alguns casos, de ATP em AMP e pirofosfato, $PP_i$). Quando representadas dessa forma, essas reações de ATP parecem ser reações de hidrólise simples, na qual a água desloca $P_i$ (ou $PP_i$), e somos tentados a dizer que a reação dependente de ATP é "impulsionada pela hidrólise do ATP". Entretanto, este *não* é o caso. A hidrólise de ATP por *de per si* geralmente realiza nada mais do que a liberação de calor, que não pode impulsionar um processo químico em um sistema isotérmico. As reações representadas por setas simples, como aquela da Figura 13-18a, quase sempre indicam um processo em duas etapas (Figura 13-18b) em que parte da molécula de ATP, ou seja, um grupo fosforil ou pirofosforil ou a porção adenilato (AMP), é primeiro transferida para uma molécula de substrato ou

**FIGURA 13-18** **A hidrólise de ATP em duas etapas.** **(a)** A contribuição do ATP para uma reação frequentemente é representada como etapa única, mas ela é quase sempre um processo em duas etapas. **(b)** É representada aqui a reação catalisada pela enzima dependente de ATP, a glutamina-sintetase. ❶ Um grupo fosforil é transferido do ATP para a glutamina; então, ❷ o grupo fosforil é deslocado pelo $NH_3$ e liberado como $P_i$.

para um resíduo de aminoácido de uma enzima, tornando-se covalentemente acoplada ao substrato ou à enzima, aumentando, dessa forma, seu conteúdo de energia livre. Em seguida, em uma segunda etapa, a porção com fosfato transferida na primeira etapa é deslocada, gerando $P_i$, $PP_i$ ou AMP. Assim, o ATP participa *covalentemente* da reação enzimática, para a qual ele fornece energia livre.

No entanto, alguns processos *envolvem* a hidrólise direta do ATP (ou GTP). Por exemplo, a ligação não covalente de ATP (ou GTP), seguida da sua hidrólise a ADP (ou GDP) e $P_i$, pode fornecer a energia para promover a alternância de algumas proteínas entre duas conformações, produzindo movimento mecânico. Isso ocorre na contração muscular (ver Figura 5-31) e no movimento de enzimas ao longo do DNA (ver Figura 25-31) ou no deslocamento dos ribossomos ao longo do RNA mensageiro (ver Figura 27-31). As reações dependentes de energia catalisadas por helicases, proteína RecA e algumas topoisomerases (Capítulo 25) também envolvem a hidrólise direta de ligações fosfoanidrido. As AAA+ ATPases envolvidas na replicação do DNA e em outros processos descritos no Capítulo 25 usam a hidrólise do ATP para ciclar proteínas associadas entre as formas ativa e inativa. As proteínas ligadoras de GTP, que agem em vias de sinalização, hidrolisam GTP diretamente para impulsionar mudanças conformacionais que extinguem sinais desencadeados por hormônios ou por outros fatores extracelulares (Capítulo 12).

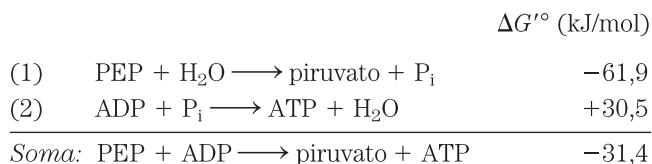
Os compostos de fosfato encontrados em organismos vivos podem ser, um tanto arbitrariamente, divididos em dois grupos com base em suas energias livres padrão de hidrólise (**Figura 13-19**). Os compostos de "alta energia" têm $\Delta G'^\circ$ de hidrólise mais negativo do que −25 kJ/mol; os compostos de "baixa energia" têm $\Delta G'^\circ$ menos negativo. Com base nesse critério, ATP, com $\Delta G'^\circ$ de hidrólise de −30,5 kJ/mol (−7,3 kcal/mol), é um composto de alta energia; glicose-6-fosfato, com $\Delta G'^\circ$ de hidrólise de −13,8 kJ/mol (−3,3 kcal/mol), é um composto de baixa energia.

O termo "ligação de fosfato de alta energia", por muito tempo usado pelos bioquímicos para descrever a ligação P—O quebrada em reações de hidrólise, é incorreto e enganoso, já que sugere erroneamente que a ligação por si mesma contém a energia. De fato, a quebra de todas as ligações químicas requer um *fornecimento* de energia. A energia livre liberada pela hidrólise de compostos de fosfato não vem da quebra da ligação especificamente; ela resulta dos produtos da reação com menor conteúdo de energia livre do que os reagentes. Para simplificar, algumas vezes será utilizado o termo "composto de fosfato de alta energia" em referência ao ATP ou a outro composto de fosfato com energia livre padrão de hidrólise elevada e negativa.

Como as variações de energia livre das reações sequenciais são aditivas (ver Seção 13.1), qualquer composto fosforilado pode ser sintetizado acoplando-se a reação de síntese à quebra de outro composto fosforilado com uma energia livre de hidrólise mais negativa. Por exemplo, como a clivagem de $P_i$ a partir de fosfoenolpiruvato libera mais energia do que a necessária para impulsionar a condensação de $P_i$ com ADP, a doação direta

**FIGURA 13-19 Classificação dos compostos de fosfato biológicos por energia livre padrão de hidrólise.** A figura apresenta os grupos fosforil, representados por Ⓟ, partindo de doadores de grupo fosforil de alta energia, passando por ATP, até moléculas receptoras (como glicose e glicerol) formando seus derivados fosfatados de baixa energia (a localização de cada grupo fosforil do composto doador ao longo da escala indica aproximadamente a $\Delta G'°$ de hidrólise). Este fluxo de grupos fosforil, catalisado pelas cinases, ocorre com uma perda global de energia livre em condições intracelulares. A hidrólise de compostos de fosfato de baixa energia libera $P_i$, que apresenta um potencial de transferência de grupo fosforil ainda menor (conforme definido no texto).

de um grupo fosforil de PEP para ADP é termodinamicamente possível:

| | | $\Delta G'°$ (kJ/mol) |
|---|---|---|
| (1) | PEP + $H_2O \longrightarrow$ piruvato + $P_i$ | −61,9 |
| (2) | ADP + $P_i \longrightarrow$ ATP + $H_2O$ | +30,5 |
| *Soma:* | PEP + ADP $\longrightarrow$ piruvato + ATP | −31,4 |

Note que, enquanto a reação global está representada como a soma algébrica das duas primeiras reações, na realidade essa é uma terceira reação distinta que não envolve $P_i$; o PEP doa um grupo fosforil *diretamente* ao ADP. Os compostos fosforilados são dotados de alto ou baixo potencial de transferência de grupo fosforil com base em sua energia livre padrão de hidrólise (como listado na Tabela 13-6). O potencial de transferência do grupo fosforil do PEP é muito elevado, o do ATP é elevado, e o da glicose-6-fosfato é baixo (Figura 13-19).

Uma grande parte do catabolismo é direcionada para a síntese de compostos de fosfato de alta energia, mas sua formação não é um objetivo em si; eles são os meios para ativação de uma ampla variedade de compostos utilizados nas reações químicas subsequentes. A transferência de um grupo fosforil a um composto agrega, efetivamente, energia livre a este composto, de modo que ele passa a ter mais energia livre para liberá-la durante as transformações químicas subsequentes. Antes foi descrito como a síntese de glicose-6-fosfato está associada à transferência de grupo fosforil do ATP. O próximo capítulo mostra como essa fosforilação da glicose ativa, ou "prepara", a glicose para as reações catabólicas que ocorrem em praticamente todas as células vivas. Devido à sua posição intermediária na escala de potencial de transferência de grupo, o ATP é capaz de transferir energia dos compostos de fosfato de alta energia, produzidos pelo catabolismo, para compostos como a glicose, convertendo-os em espécies mais reativas. Assim, o ATP serve como a moeda universal de energia em todas as células vivas.

Uma característica mais química do ATP é crucial para sua função no metabolismo: embora em solução aquosa o ATP seja termodinamicamente instável, sendo, portanto, um bom doador de grupos fosforil, ele é *cineticamente* estável. Devido à enorme energia de ativação (200 a 400 kJ/mol) necessária para a clivagem não enzimática de sua ligação fosfoanidrido, o ATP não é capaz de doar espontaneamente grupos fosforil para a água ou para as centenas de outras potenciais moléculas aceptoras na célula. A transferência dos grupos fosforil do ATP ocorre somente quando estão presentes enzimas específicas para reduzir a energia de ativação. A célula é, portanto, capaz de regular a disponibilidade de energia transportada pelo ATP por meio da regulação das várias enzimas que atuam sobre ele.

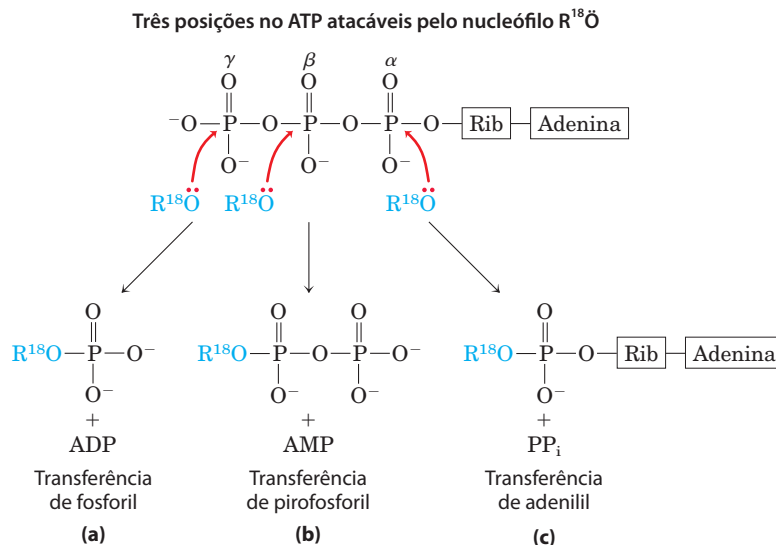
## O ATP doa grupos fosforil, pirofosforil e adenilil

As reações do ATP geralmente são substituições nucleofílicas $S_N2$ (ver Seção 13.2) em que o nucleófilo pode ser, por exemplo, o oxigênio de um álcool ou de um carboxilato, ou um nitrogênio da creatina ou da cadeia lateral de arginina ou histidina. Os três fosfatos do ATP são suscetíveis ao ataque nucleofílico (**Figura 13-20**), e cada posição de ataque resulta em um tipo diferente de produto.

O ataque nucleofílico por um álcool sobre o $\gamma$-fosfato (Figura 13-20a) desloca ADP e produz um novo éster-fosfato. Estudos realizados com reagentes marcados com $^{18}O$ mostraram que a ligação de oxigênio no novo composto é

**FIGURA 13-20 Reações de deslocamento nucleofílico do ATP.** Qualquer um dos três átomos de P ($\alpha$, $\beta$ ou $\gamma$) pode servir como o alvo eletrofílico para o ataque nucleofílico – neste caso, pelo nucleófilo marcado R—$^{18}$O:. O nucleófilo pode ser um álcool (ROH), um grupo carboxil ($RCOO^-$) ou um fosfoanidrido (p. ex., um nucleosídeo mono- ou difosfato). **(a)** Quando o oxigênio do nucleófilo ataca a posição $\gamma$, a ligação de oxigênio do produto está marcada, indicando que o grupo transferido do ATP é um fosforil (—$PO_3^{2-}$) e não um fosfato (—$OPO_3^{2-}$). **(b)** O ataque na posição $\beta$ desloca AMP e leva à transferência de um grupo pirofosforil (não pirofosfato) para o nucleófilo. **(c)** O ataque na posição $\alpha$ desloca $PP_i$ e transfere o grupo adenilil para o nucleófilo.

Três posições no ATP atacáveis pelo nucleófilo R$^{18}$Ö

Transferência de fosforil (a) — Transferência de pirofosforil (b) — Transferência de adenilil (c)

derivada do álcool, e não do ATP; o grupo transferido do ATP é, consequentemente, um fosforil (—$PO_3^{2-}$), e não um fosfato (—$OPO_3^{2-}$). A transferência de grupos fosforil do ATP para o glutamato (Figura 13-18) ou para a glicose (p. 219) envolve um ataque na posição $\gamma$ da molécula de ATP.

O ataque ao fosfato $\beta$ do ATP desloca AMP e transfere um grupo pirofosforil (não pirofosfato) ao nucleófilo atacante (Figura 13-20b). Por exemplo, a formação de 5-fosforibosil-1-pirofosfato (p. 892), um intermediário-chave na síntese dos nucleotídeos, é resultante do ataque de uma —OH da ribose sobre um fosfato $\beta$.

O ataque nucleofílico na posição $\alpha$ do ATP desloca $PP_i$ e transfere adenilato (5′-AMP) como um grupo adenilil (Figura 13-20c); a reação é uma **adenililação** (uma das palavras mais truncadas da linguagem bioquímica). Note que a hidrólise da ligação $\alpha$-$\beta$ fosfoanidrido libera consideravelmente mais energia (~46 kJ/mol) do que a hidrólise da ligação $\beta$-$\gamma$ (~31 kJ/mol) (Tabela 13-6). Além disso, o $PP_i$ formado como subproduto da adenililação é hidrolisado a dois $P_i$ pela enzima ubíqua **pirofosfatase inorgânica**, liberando 19 kJ/mol e fornecendo, portanto, energia adicional de "arranque" para a reação de adenililação. De fato, as duas ligações fosfoanidrido do ATP são rompidas na reação global. As reações de adenililação são, portanto, termodinamicamente muito favoráveis. Quando a energia do ATP é utilizada para promover uma reação metabólica particularmente desfavorável, a adenililação com frequência é o mecanismo de acoplamento de energia. A ativação de ácidos graxos é um bom exemplo dessa estratégia de acoplamento de energia.

A primeira etapa na ativação de um ácido graxo – seja para a oxidação com geração de energia ou para o uso na síntese de lipídeos mais complexos – é a formação de seu éster tiol (ver Figura 17-5). A condensação direta de um ácido graxo com a coenzima A é endergônica, mas a formação da acil-CoA graxo torna-se exergônica pela remoção sequencial de *dois* grupos fosforil do ATP. Primeiramente, o adenilato (AMP) é transferido do ATP para o grupo carboxil do ácido graxo, formando um anidrido misto (acil graxo-adenilato) e liberando $PP_i$. O grupo tiol da coenzima A, então, desloca o grupo adenilil e forma um tioéster com o ácido graxo. A soma dessas duas reações é energeticamente equivalente à hidrólise exergônica do ATP em AMP e $PP_i$ ($\Delta G'^\circ = -45{,}6$ kJ/mol) e à formação endergônica de acil-CoA graxo ($\Delta G'^\circ = -31{,}4$ kJ/mol). A formação de acil-CoA graxo torna-se energeticamente favorável pela hidrólise do $PP_i$ pela pirofosfatase inorgânica. Assim, na ativação de um ácido graxo, as duas ligações fosfoanidrido do ATP são rompidas. O $\Delta G'^\circ$ resultante é a soma dos valores de $\Delta G'^\circ$ para a quebra dessas ligações, ou seja, $-45{,}6$ kJ/mol + ($-19{,}2$) kJ/mol:

$$\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{AMP} + 2\text{P}_i \quad \Delta G'^\circ = -64{,}8 \text{ kJ/mol}$$

A ativação de aminoácidos que precede sua polimerização em proteínas (ver Figura 27-19) é realizada por um grupo análogo de reações em que a coenzima A é substituída por uma molécula de RNA de transferência. Uma utilização interessante da clivagem de ATP em AMP e $PP_i$ ocorre no vaga-lume, que utiliza ATP como fonte de energia para a produção de lampejos de luz (Quadro 13-1).

## A montagem de macromoléculas informacionais requer energia

Quando precursores simples se reúnem formando polímeros de alta massa molecular com sequências definidas (DNA, RNA, proteínas), como descrito em detalhe na Parte III, é necessário energia tanto para a condensação das unidades monoméricas quanto para a criação de sequências *ordenadas*. Os precursores para a síntese de DNA e RNA são os nucleosídeos-trifosfato, e a polimerização é acompanhada pela clivagem da ligação fosfoanidrido entre os fosfatos $\alpha$ e $\beta$, com a liberação de $PP_i$ (Figura 13-20). As unidades monoméricas transferidas para o polímero em crescimento nessas reações são adenilato (AMP), guanilato (GMP), citidilato (CMP) ou uridilato (UMP) para a síntese de RNA, e seus análogos desóxi (com TMP no lugar de UMP) para a síntese de DNA. Como mencionado anteriormente, a ativação dos aminoácidos para a síntese de pro-

## QUADRO 13-1 Lampejos dos vaga-lumes: indicadores incandescentes de ATP

A bioluminescência requer consideráveis quantidades de energia. No vaga-lume, o ATP é utilizado em um grupo de reações que convertem energia química em energia luminosa. Em 1950, a partir de milhares de vaga-lumes coletados por crianças em Baltimore e arredores, William McElroy e seus colaboradores da Universidade Johns Hopkins isolaram os principais componentes bioquímicos: a luciferina (ácido carboxílico complexo) e a luciferase (enzima). A geração de um lampejo de luz requer a ativação de luciferina por uma reação enzimática envolvendo a clivagem de pirofosfato do ATP para formar luciferil-adenilato (Figura Q-1). Na presença de oxigênio molecular e luciferase, a luciferina sofre descarboxilação oxidativa, um processo em várias etapas, formando oxiluciferina. Esse processo é acompanhado pela emissão de luz. A cor do lampejo de luz difere de acordo com a espécie de vaga-lume e parece ser determinada por diferenças na estrutura da luciferase. A luciferina é regenerada a partir da oxiluciferina, em uma série de reações subsequentes.

No laboratório, a luciferina e a luciferase purificadas de vaga-lume são utilizadas para medir quantidades muito pequenas de ATP através da intensidade de luz produzida. Quantidades tão pequenas quanto alguns picomoles ($10^{-12}$ mol) de ATP podem ser detectados dessa forma. A técnica de pirossequenciamento de DNA é baseada em *flashes* de luz originários da reação da luciferina-luciferase para detectar a presença de ATP após a adição de nucleotídeos a uma fita de DNA em crescimento (Ver Figura 9-25).

Vaga-lume, besouro da família *Lampyridae*.

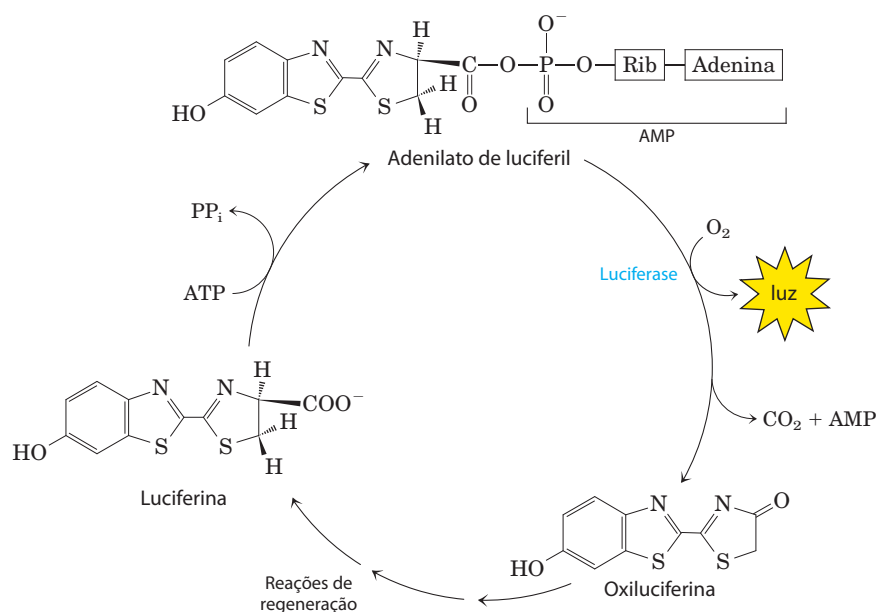



**FIGURA Q-1** Componentes importantes no ciclo de bioluminescência do vaga-lume.

teínas envolve a doação de grupos adenilil do ATP, e o Capítulo 27 mostra que várias etapas da síntese de proteínas no ribossomo também são acompanhadas pela hidrólise de GTP. Em todos esses casos, a quebra exergônica de um nucleosídeo-trifosfato está acoplada ao processo endergônico de sintetizar um polímero de sequência específica.

### O ATP fornece energia para o transporte ativo e a contração muscular

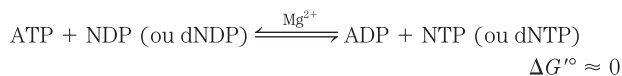
O ATP é capaz de fornecer energia para transportar um íon ou uma molécula, por uma membrana, para outro compartimento aquoso, onde sua concentração é mais elevada (ver Figura 11-38). Os processos de transporte são os principais consumidores de energia; nos rins e no cérebro humano, por exemplo, dois terços da energia consumida quando em repouso são usados para bombear $Na^+$ e $K^+$ através da membrana plasmática por meio da $Na^+K^+$ – ATPase. O transporte de $Na^+$ e $K^+$ é movido por fosforilação e desfosforilação cíclica da proteína transportadora, sendo o ATP o doador de grupo fosforil. A fosforilação dependente de $Na^+$ da $Na^+K^+$-ATPase induz uma alteração na conformação da proteína, e a desfosforilação dependente de $K^+$ favorece o retorno à conformação original. Cada ciclo no processo de transporte resulta na conversão de ATP em ADP e $P_i$, sendo a variação da energia livre da hidrólise do ATP responsável pelas alterações cíclicas na conformação da proteína que resultam no bombeamento eletrogênico de $Na^+$ e $K^+$. Note que, nesse caso, o ATP interage covalentemente pela transferência de grupo fosforil para a enzima, e não para o substrato.

No sistema contrátil das células do músculo esquelético, a miosina e a actina são proteínas especializadas em transduzir a energia química do ATP em movimento (ver Figura 5-31). O ATP liga-se fortemente, mas não covalentemente, a uma determinada conformação da miosina, mantendo a proteína nessa conformação. Quando a miosina catalisa a hidrólise do ATP ligado, ADP e $P_i$ se dissociam, permitindo o relaxamento da proteína em uma segunda conformação até que outra molécula de ATP se ligue. A ligação e a subsequente hidrólise do ATP (pela miosina-ATPase) fornecem a energia que impulsiona as mudanças cíclicas na conformação da cabeça de miosina. A variação na conformação de muitas moléculas de miosina individuais resulta no deslizamento das fibras de miosina ao longo dos filamentos de actina (ver Figura 5-30), o que leva à contração macroscópica da fibra muscular. Como mencionado anteriormente, essa produção de movimento mecânico com o gasto de ATP é um dos poucos casos em que a hidrólise de ATP por si, e não a transferência de grupos do ATP, é a fonte da energia química em um processo acoplado.

## As transfosforilações entre nucleotídeos ocorrem em todos os tipos celulares

Embora o ATP tenha sido focalizado como a moeda energética da célula e o doador de grupos fosforil, todos os outros nucleosídeos-trifosfato (GTP, UTP e CTP) e todos os desoxinucleotídeos-trifosfato (dATP, dGTP, dTTP e dCTP) são energeticamente equivalentes ao ATP. As variações de energia livre padrão associadas à hidrólise de suas ligações fosfoanidrida são praticamente idênticas àquelas do ATP, mostradas na Tabela 13-6. Na preparação para as suas diferentes funções biológicas, esses outros nucleotídeos são gerados e mantidos na forma de nucleosídeos-trifosfato (NTP) por transferência de grupo fosforil aos nucleosídeos-difosfato correspondentes (NDP) e nucleosídeos-monofosfato (NMP).

O ATP é o principal composto de fosfato de alta energia produzido pelo catabolismo nos processos de glicólise, fosforilação oxidativa e, nas células fotossintéticas, fotofosforilação. Diversas enzimas são capazes de transportar grupos fosforil do ATP para outros nucleosídeos. A **nucleosídeo-difosfato-cinase**, encontrada em todas as células, catalisa a reação

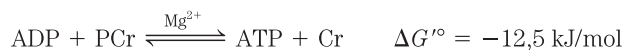
$$\text{ATP} + \text{NDP (ou dNDP)} \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} \text{ADP} + \text{NTP (ou dNTP)} \qquad \Delta G'^{\circ} \approx 0$$

Embora essa reação seja totalmente reversível, a relação [ATP]/[ADP] relativamente alta nas células em geral impulsiona a reação para a direita, com a formação líquida de NTP e dNTP. Na realidade, a enzima catalisa a transferência de grupo fosforil em duas etapas, constituindo um exemplo clássico de um mecanismo de deslocamento duplo (pingue-pongue) (**Figura 13-21**; ver também Figura 6-13b). Primeiramente, a transferência de um grupo fosforil do ATP ao resíduo de His do sítio ativo gera um intermediário fosfoenzima; a seguir, o grupo fosforil é transferido do resíduo de His para um receptor NDP. Como a enzima não é específica para a base do NDP e funciona igualmente bem sobre dNDP e NDP, ela pode sintetizar todos os NTP e dNTP, desde que sejam fornecidos os NDP correspondentes e uma fonte de ATP.

A transferência de grupos fosforil do ATP resulta em um acúmulo de ADP; por exemplo, quando o músculo está contraindo vigorosamente, ADP se acumula e interfere com a contração dependente de ATP. Durante períodos de intensa demanda por ATP, a célula reduz a concentração de ADP e, ao mesmo tempo, repõe ATP pela ação da **adenilato-cinase**:

$$2\text{ADP} \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} \text{ATP} + \text{AMP} \qquad \Delta G'^{\circ} \approx 0$$

Esta reação é totalmente reversível, de modo que, após o término da demanda intensa por ATP, a enzima pode reciclar AMP convertendo-o em ADP, que pode ser, então, fosforilado a ATP na mitocôndria. Uma enzima semelhante, a guanilato-cinase, converte GMP em GDP com gasto de ATP. Por meio de vias como essas, a energia conservada na produção catabólica de ATP é utilizada para suprir a célula com todos os NTP e dNTP necessários.

A fosfocreatina (PCr; Figura 13-15), também chamada de creatina-fosfato, atua como uma fonte imediata de grupos fosforil para a síntese rápida de ATP a partir de ADP. A concentração de PCr no músculo esquelético é de cerca de 30 mM, quase 10 vezes a concentração de ATP, e em outros tecidos como músculo liso, cérebro e rins a [PCr] é de 5 a 10 mM. A enzima **creatina-cinase** catalisa a reação reversível

$$\text{ADP} + \text{PCr} \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} \text{ATP} + \text{Cr} \qquad \Delta G'^{\circ} = -12{,}5 \text{ kJ/mol}$$

Quando uma súbita demanda por energia esgota o ATP, o reservatório de PCr é utilizado para a reposição de ATP a uma velocidade consideravelmente maior do que a síntese

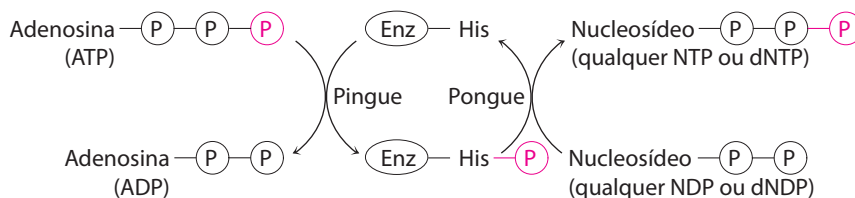
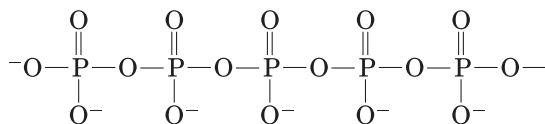



**FIGURA 13-21 O mecanismo pingue-pongue da nucleosídeo-difosfato-cinase.** A enzima liga seu primeiro substrato (ATP em nosso exemplo), e um grupo fosforil é transferido para a cadeia lateral de um resíduo de His. O ADP sai, e outro nucleosídeo (ou desoxinucleosídeo) difosfato o substitui, sendo convertido ao trifosfato correspondente por transferência do grupo fosforil do resíduo fosfo-histidina.

de ATP pelas vias catabólicas. Quando a demanda por energia diminui, o ATP produzido por catabolismo é utilizado para reconstituir o reservatório de PCr pela reação inversa da creatina-cinase (ver Quadro 23-2). Os organismos inferiores utilizam outras moléculas semelhantes à PCr (coletivamente chamadas de **fosfágenos**) como reservatórios de grupos fosforil.

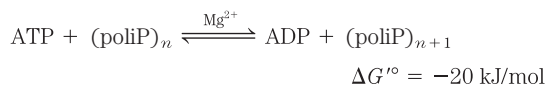
## O polifosfato inorgânico é um doador potencial de grupo fosforil

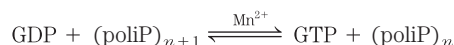
O polifosfato inorgânico, poliP (ou $[\text{poliP}]_n$, no qual $n$ é o número de resíduos ortofosfatos) é um polímero linear, composto de dezenas ou centenas de resíduos de $P_i$ ligados por meio de ligações fosfoanidrido. Esse polímero, presente em todos os organismos, pode acumular-se em níveis elevados em algumas células. Em leveduras, por exemplo, a quantidade de poliP acumulada nos vacúolos representaria, se distribuída uniformemente por toda célula, uma concentração de 200 mM! (Compare com as concentrações de outros doadores de grupos fosforil listados na Tabela 13-5.)

$$^{-}O-\overset{\overset{O}{\|}}{\underset{\underset{O^-}{|}}{P}}-O-\overset{\overset{O}{\|}}{\underset{\underset{O^-}{|}}{P}}-O-\overset{\overset{O}{\|}}{\underset{\underset{O^-}{|}}{P}}-O-\overset{\overset{O}{\|}}{\underset{\underset{O^-}{|}}{P}}-O-\overset{\overset{O}{\|}}{\underset{\underset{O^-}{|}}{P}}-O-$$

Polifosfato inorgânico (poliP)

Uma função potencial do poliP é atuar como fosfágeno, um reservatório de grupos fosforil que pode ser usado para gerar ATP, assim como a creatina-fosfato é utilizada no músculo. O poliP tem, aproximadamente, o mesmo potencial de transferência de grupo fosforil que o $PP_i$. O polifosfato mais curto, $PP_i$ ($n = 2$), pode atuar como fonte de energia para o transporte ativo de $H^+$ através da membrana do vacúolo em células vegetais. O $PP_i$ é o doador de grupo fosforil para pelo menos uma forma da enzima fosfofrutocinase em plantas, uma função exercida por ATP em animais e micróbios (p. 550). A descoberta de altas concentrações de poliP em condensados vulcânicos e em fontes de vapor sugere que ele pode ter servido como fonte de energia em tempos prebióticos e na evolução celular inicial.

Em bactérias, a enzima **polifosfato-cinase-1** (PPK-1) catalisa a reação reversível

$$\text{ATP} + (\text{poliP})_n \xrightleftharpoons{\text{Mg}^{2+}} \text{ADP} + (\text{poliP})_{n+1}$$
$$\Delta G'^{\circ} = -20 \text{ kJ/mol}$$

por um mecanismo envolvendo um intermediário fosfo-histidina ligado à enzima (lembre-se do mecanismo da nucleosídeo-difosfato-cinase, descrito na Figura 13-21). Uma segunda enzima, a **polifosfato-cinase-2** (PPK-2), catalisa a síntese reversível de GTP (ou ATP) a partir de polifosfato e GDP (ou ADP):

$$\text{GDP} + (\text{poliP})_{n+1} \xrightleftharpoons{\text{Mn}^{2+}} \text{GTP} + (\text{poliP})_n$$

Imagina-se que a PPK-2 atue principalmente no sentido da síntese de GTP e ATP, e que a PPK-1 atue no sentido da síntese do polifosfato. PPK-1 e PPK-2 estão presentes em uma ampla variedade de bactérias, incluindo muitas espécies patogênicas.

Em bactérias, os níveis elevados de poliP têm sido relacionados com a indução da expressão de genes envolvidos na adaptação do organismo às condições de inanição ou outras ameaças à sobrevivência. Em *Escherichia coli*, por exemplo, ocorre o acúmulo de poliP quando as células estão carentes de aminoácidos ou $P_i$, e esse acúmulo confere uma vantagem de sobrevivência. A deleção dos genes que codificam as polifosfato-cinases reduz a capacidade de certas bactérias patogênicas de invadir os tecidos animais. Essas enzimas podem, portanto, ser alvos adequados no desenvolvimento de novos antibióticos.

Nenhum gene de levedura codifica uma proteína semelhante à PPK; todavia, quatro genes – não relacionados aos genes da PPK de bactérias – são necessários para a síntese do polifosfato. O mecanismo de síntese do polifosfato em eucariotos parece ser bem diferente daquele em bactérias.

### RESUMO 13.3 Transferência de grupos fosforil e ATP

- O ATP é a conexão química entre catabolismo e anabolismo. Ele é a moeda energética das células vivas. A conversão exergônica de ATP em ADP e $P_i$, ou em AMP e $PP_i$, está acoplada a muitas reações e processos endergônicos.
- A hidrólise direta de ATP é a fonte de energia em alguns processos impulsionados por mudanças conformacionais, mas em geral não é a hidrólise de ATP e sim a transferência de um grupo fosforil, pirofosforil ou adenilil do ATP a um substrato ou a uma enzima que acopla a energia da quebra do ATP às transformações endergônicas de substratos.
- Por meio dessas reações de transferência de grupo, o ATP fornece energia para as reações anabólicas, incluindo a síntese de macromoléculas informacionais, e para o transporte de moléculas e íons através das membranas contra gradientes de concentração e de potencial elétrico.
- Para manter seu elevado potencial de transferência de grupos, a concentração de ATP deve ser mantida muito acima da concentração de equilíbrio das reações geradoras de energia do catabolismo.
- As células contêm outros metabólitos com energia livre de hidrólise elevada e negativa, incluindo fosfoenolpiruvato, 1,3-bifosfoglicerato e fosfocreatina. Esses compostos de alta energia, como o ATP, possuem elevado potencial de transferência de grupos fosforil. Os tioésteres também possuem elevada energia livre de hidrólise.
- O polifosfato inorgânico, presente em todas as células, pode atuar como um reservatório de grupos fosforil com elevado potencial de transferência de grupos.

## 13.4 Reações biológicas de oxidação-redução

A transferência de grupos fosforil é uma característica central do metabolismo. Igualmente importante é outro tipo de transferência, a de elétrons nas reações de oxidação-redução. Essas reações envolvem a perda de elétrons por uma espécie química, que é oxidada, e o ganho de elétrons por outra espécie, que é reduzida. O fluxo de elétrons nas reações de oxidação-redução é responsável, direta ou indiretamente, por todo trabalho realizado por organismos vivos. Em organismos não fotossintéticos, as fontes de elétrons são os compostos reduzidos (alimentos); em organismos fotossintéticos, o doador de elétrons inicial é uma espécie química excitada pela absorção de luz. O caminho do fluxo de elétrons no metabolismo é complexo. Os elétrons movem-se de diferentes intermediários metabólicos para transportadores de elétrons especializados, em reações catalisadas enzimaticamente. Os transportadores, por sua vez, doam elétrons para receptores com afinidade maior por elétrons, com a liberação de energia. As células contêm uma grande variedade de transdutores moleculares de energia, que convertem a energia do fluxo de elétrons em trabalho útil.

Inicialmente será discutido como o trabalho pode ser realizado por uma força eletromotriz, considerando em seguida as bases teóricas e experimentais para medir as variações de energia em reações de oxidação, em termos de força eletromotriz, e a relação entre essa força, expressa em volts, e a variação de energia livre, expressa em joules. Para finalizar, serão descritas as estruturas e a química da oxidação-redução dos transportadores especializados de elétrons mais comuns, os quais você encontrará repetidamente nos capítulos seguintes.

### O fluxo de elétrons pode realizar trabalho biológico

Sempre que se usa um motor elétrico, uma lâmpada ou um aquecedor elétrico, ou ainda quando uma faísca promove a combustão da gasolina em um motor de automóveis, usa-se o fluxo de elétrons para realizar trabalho. No circuito que fornece energia a um motor, a fonte de elétrons pode ser uma bateria contendo duas espécies químicas com afinidades diferentes por elétrons. Os fios elétricos proporcionam um caminho para o fluxo dos elétrons entre as espécies químicas localizadas em um polo da bateria, por meio do motor, até as espécies químicas localizadas no outro polo da bateria. Como as duas espécies químicas diferem em suas afinidades por elétrons, eles fluem espontaneamente ao longo do circuito, impulsionados por uma força proporcional à diferença de afinidade por elétrons, a **força eletromotriz** (**fem**). A fem (geralmente alguns volts) é capaz de realizar trabalho caso um transdutor de energia apropriado – nesse caso um motor – seja incluído no circuito. O motor pode ser acoplado a uma grande variedade de equipamentos mecânicos para realizar trabalho útil.

As células vivas têm um "circuito" biológico análogo, com compostos relativamente reduzidos, por exemplo a glicose, como fonte de elétrons. À medida que a glicose é enzimaticamente oxidada, os elétrons liberados fluem de modo espontâneo por uma série de intermediários transportadores de elétrons para outras espécies químicas, como o $O_2$. Esse fluxo de elétrons é exergônico, já que o $O_2$ tem maior afinidade por elétrons do que os intermediários transportadores de elétrons. A fem resultante fornece energia para uma grande variedade de transdutores moleculares de energia (enzimas e outras proteínas) que realizam trabalho biológico. Na mitocôndria, por exemplo, enzimas ligadas à membrana acoplam o fluxo de elétrons à produção de uma diferença de pH transmembrana, além de um potencial elétrico transmembrana, realizando trabalho osmótico e elétrico. O gradiente de prótons assim formado tem energia potencial, algumas vezes chamada de força próton-motriz, em analogia à força eletromotriz. Outra enzima, a ATP-sintetase localizada na membrana interna da mitocôndria, usa a força próton-motriz para realizar trabalho químico: a síntese de ATP a partir de ADP e $P_i$ à medida que os prótons fluem espontaneamente através da membrana. Similarmente, enzimas localizadas na membrana em *E. coli* convertem fem em força próton-motriz, que é posteriormente utilizada para impulsionar o movimento flagelar. Os princípios da eletroquímica que governam as variações de energia nos circuitos macroscópicos, como um motor elétrico e uma bateria, se aplicam com a mesma validade para processos moleculares associados ao fluxo de elétrons em células vivas.

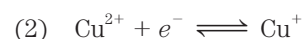
### As reações de oxidação-redução podem ser descritas como semirreações

Embora a oxidação e a redução ocorram em conjunto, para descrever a transferência de elétrons é conveniente considerar as duas metades de uma reação de oxidação-redução separadamente. Por exemplo, a oxidação do íon ferro pelo íon cobre,

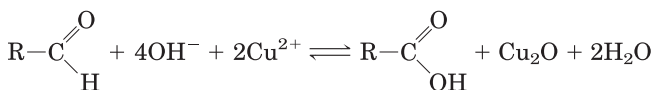
$$Fe^{2+} + Cu^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + Cu^{+}$$

pode ser descrita nos termos de duas semirreações:

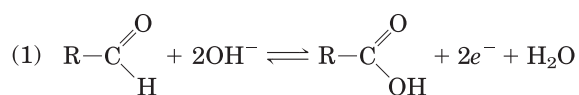
$$(1) \quad Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + e^{-}$$

$$(2) \quad Cu^{2+} + e^{-} \rightleftharpoons Cu^{+}$$

A molécula doadora de elétrons em uma reação de oxidação-redução é chamada de agente redutor, ou simplesmente redutor; a molécula receptora de elétrons é o agente oxidante, ou simplesmente oxidante. Determinado agente, como um íon ferro, que existe no estado ferroso ($Fe^{2+}$) ou férrico ($Fe^{3+}$), atua como par conjugado oxidante-redutor (par redox), assim como um ácido e a base correspondente atuam como par conjugado ácido-base. Lembre-se do Capítulo 2 que existe uma equação geral das reações acidobásicas: doador de próton $\rightleftharpoons$ $H^{+}$ + aceptor de próton. Nas reações redox existe uma equação geral similar: doador de elétrons (redutor) $\rightleftharpoons$ $e^{-}$ + aceptor de elétrons (oxidante). Na semirreação reversível acima (1), $Fe^{2+}$ é o doador de elétrons e $Fe^{3+}$ é o aceptor de elétrons: juntos, $Fe^{2+}$ e $Fe^{3+}$ constituem um **par conjugado redox**.

As transferências de elétrons nas reações de oxidação-redução de compostos orgânicos não são fundamentalmente diferentes daquelas das espécies inorgânicas. Considere a oxidação de um açúcar redutor (um aldeído ou uma cetona) pelo íon cobre:

$$R{-}C(=O){-}H + 4OH^{-} + 2Cu^{2+} \rightleftharpoons R{-}C(=O){-}OH + Cu_2O + 2H_2O$$

Esta equação global pode ser expressa como duas semirreações:

$$(1)\quad R{-}C(=O){-}H + 2OH^- \rightleftharpoons R{-}C(=O){-}OH + 2e^- + H_2O$$

$$(2)\quad 2Cu^{2+} + 2e^- + 2OH^- \rightleftharpoons Cu_2O + H_2O$$

Como são removidos dois elétrons do carbono do aldeído, a segunda metade da reação (a redução por um elétron do íon cúprico a cuproso) deve ser multiplicada por dois para equilibrar a equação global.

## As oxidações biológicas frequentemente envolvem desidrogenação

Nas células vivas, o carbono encontra-se em diferentes estados de oxidação (**Figura 13-22**). Quando um átomo de carbono compartilha um par de elétrons com outro átomo (normalmente H, C, S, N ou O), o compartilhamento é desigual, em favor do átomo mais eletronegativo. A ordem crescente de eletronegatividade é $H < C < S < N < O$. De forma muito simplificada, porém útil, o átomo mais eletronegativo "possui" os elétrons da ligação que ele compartilha com o outro átomo. Por exemplo, no metano ($CH_4$), o carbono é mais eletronegativo que os quatro hidrogênios ligados a ele, portanto o átomo de carbono "possui" os oito elétrons da ligação (Figura 13-22). No etano, os elétrons da ligação C—C são igualmente compartilhados, portanto cada átomo de carbono "possui" apenas sete dos seus oito elétrons de ligação. No etanol, C-1 é menos eletronegativo que o oxigênio ao qual ele está ligado, e assim o átomo de O "possui" os dois elétrons da ligação C—O, deixando C-1 com apenas cinco elétrons de ligação. Com a perda formal de cada um dos elétrons "possuídos", o átomo de carbono sofre oxidação – mesmo quando o oxigênio não está envolvido, como na conversão de um alcano ($—CH_2—CH_2—$) em um alceno ($—CH{=}CH—$). Neste caso, a oxidação (perda de elétrons) coincide com a perda de hidrogênio. Em sistemas biológicos, como mencionado anteriormente neste capítulo, a oxidação muitas vezes é sinônimo de **desidrogenação**, e muitas enzimas que catalisam reações de oxidação são **desidrogenases**. Note que os compostos mais reduzidos na Figura 13-22 (superior) são mais ricos em hidrogênio do que em oxigênio, enquanto os compostos mais oxidados (inferior) contêm mais oxigênios e menos hidrogênios.

Nem todas as reações de oxidação-redução envolvem carbono. Por exemplo, na conversão de nitrogênio molecular em amônia, $6H^+ + 6e^- + N_2 \rightarrow 2NH_3$, os átomos de nitrogênio são reduzidos.

Os elétrons são transferidos de uma molécula (doadora de elétrons) para outra (aceptora de elétrons) por meio de uma das quatro vias:

1. Diretamente *como elétrons*. Por exemplo, o par redox $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ pode transferir um elétron para o par redox $Cu^+/Cu^{2+}$:

$$Fe^{2+} + Cu^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + Cu^+$$

| Composto | Estrutura | Nº |
|---|---|---|
| Metano | H:C:H (com H acima e abaixo) | 8 |
| Etano (alcano) | H:C:C:H | 7 |
| Eteno (alceno) | H₂C::CH₂ | 6 |
| Etanol (álcool) | H:C:C:O:H | 5 |
| Acetileno (alcino) | H:C:::C:H | 5 |
| Formaldeído | H₂C::O | 4 |
| Acetaldeído (aldeído) | H:C:C(H)::O | 3 |
| Acetona (cetona) | H:C:C(::O):C:H | 2 |
| Ácido fórmico (ácido carboxílico) | H:C(::O):O:H | 2 |
| Monóxido de carbono | :C:::O: | 2 |
| Ácido acético (ácido carboxílico) | H:C:C(::O):O:H | 1 |
| Dióxido de carbono | O::C::O | 0 |

**FIGURA 13-22 Diferentes níveis de oxidação dos compostos de carbono na biosfera.** Para aproximar o nível de oxidação desses compostos, concentre-se no átomo de carbono em vermelho e em seus elétrons de ligação. Quando este carbono estiver ligado a um átomo de H, menos eletronegativo, os dois elétrons da ligação (em vermelho) serão cedidos ao carbono. Quando o carbono estiver ligado a outro carbono, os elétrons da ligação serão igualmente compartilhados, de modo que um dos dois elétrons é cedido ao carbono em vermelho. Quando o carbono em vermelho estiver ligado a um átomo de O, mais eletronegativo, os elétrons da ligação são cedidos ao oxigênio. O número à direita de cada composto é o número de elétrons "pertencentes" ao carbono em vermelho, uma expressão aproximada do grau de oxidação de cada composto. À medida que o carbono em vermelho sofre oxidação (perde elétrons), o número torna-se menor. Assim, o estado de oxidação aumenta da parte superior para a inferior da lista.

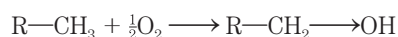
2. Como *átomos de hidrogênio*. Lembre-se que o átomo de hidrogênio consiste em um próton ($H^+$) e um único elétron ($e^-$). Neste caso, a equação geral é

$$AH_2 \rightleftharpoons A + 2e^- + 2H^+$$

onde $AH_2$ é o doador de hidrogênio/elétron. (Não confunda a reação acima com a dissociação de um ácido que envolve um próton e nenhum elétron.) $AH_2$ e A juntos constituem um par conjugado redox ($A/AH_2$), o qual é capaz de reduzir outro composto B (ou par redox, $B/BH_2$) por transferência de átomos de hidrogênio:

$$AH^2 + B \rightleftharpoons A + BH^2$$

3. Como um *íon hidreto* ($:H^-$), o qual contém dois elétrons. Isso ocorre no caso de desidrogenases ligadas à NAD, descritas posteriormente.
4. Pela *combinação direta com oxigênio*. Neste caso, o oxigênio combina com um redutor orgânico e é covalentemente incorporado no produto, como na oxidação de um hidrocarboneto em um álcool:

$$R{-}CH_3 + \tfrac{1}{2}O_2 \longrightarrow R{-}CH_2{\longrightarrow}OH$$

O hidrocarboneto é o doador de elétrons e o átomo de oxigênio é o aceptor de elétrons.

Todos os quatro tipos de transferência de elétrons ocorrem nas células. O termo **equivalente redutor** é comumente usado para designar um único equivalente eletrônico que participa de uma reação de oxidação-redução, não importando se este equivalente é um elétron *em si*, parte de um átomo de hidrogênio ou mesmo um íon hidreto, ou ainda se a transferência do elétron ocorre em uma reação com oxigênio gerando um produto oxigenado. Como as moléculas combustíveis biológicas geralmente sofrem desidrogenação enzimática perdendo *dois* equivalentes redutores de cada vez, e já que cada átomo de oxigênio é capaz de receber dois equivalentes redutores, os bioquímicos, por convenção, referem-se à unidade de oxidação biológica como dois equivalentes redutores que passam do substrato para o oxigênio.

## Os potenciais de redução medem a afinidade por elétrons

Quando dois pares conjugados redox estão juntos em solução, a transferência de elétrons do par doador para o par aceptor pode ocorrer espontaneamente. A tendência para que a reação ocorra depende da afinidade relativa do aceptor de elétrons de cada par redox pelos elétrons. O **potencial de redução padrão, *E*°**, a medida (em volts) dessa afinidade, pode ser determinado em um experimento como o descrito na **Figura 13-23**. Os eletroquímicos escolheram como um padrão de referência a semirreação

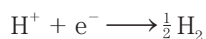
$$H^+ + e^- \longrightarrow \tfrac{1}{2}H_2$$

Ao eletrodo em que essa semirreação ocorre (chamado semicélula) é atribuído arbitrariamente um potencial de redução padrão $E° = 0{,}00$ V. Quando esse eletrodo de hidrogênio está conectado por meio de um circuito externo a outra semicélula em que as espécies oxidadas e suas espécies reduzidas correspondentes estão presentes em concentrações-padrão (25°C, cada soluto a 1 M, e cada gás a 101,3 kPa), os elétrons tendem a fluir pelo circuito externo, partindo da semicélula de menor valor de $E°$ para a semicélula de maior valor de $E°$. Por convenção, a uma semicélula que retira elétrons de uma célula padrão de hidrogênio é designado um valor positivo de $E°$, e àquela que doa elétrons para a célula de hidrogênio, um valor negativo. Quando duas semicélulas estão conectadas, aquela com maior valor de $E°$ (mais positiva) será reduzida; ela tem o maior potencial de redução.

**FIGURA 13-23 Medida do potencial de redução padrão ($E'°$) de um par redox.** Os elétrons fluem do eletrodo de teste para o eletrodo de referência, ou vice-versa. A semicélula de referência é o eletrodo de hidrogênio, como representado aqui, a pH zero. A força eletromotriz (fem) deste eletrodo é designada 0,00 V. Em pH 7,0 (25°C) na célula de teste, o $E'°$ do eletrodo de hidrogênio é −0,414 V. O sentido do fluxo dos elétrons depende da "pressão" relativa dos elétrons ou do potencial das duas células. Uma ponte salina contendo uma solução de KCl saturada fornece um caminho para o movimento dos íons entre a célula de teste e a célula de referência. A partir da fem observada e a fem conhecida da célula de referência, o aparelho é capaz de medir a fem da célula de teste contendo o par redox. A célula que recebe os elétrons tem, por convenção, o potencial de redução mais positivo.

O potencial de redução de uma semicélula não depende apenas das espécies químicas presentes, mas também de suas atividades, estimadas por suas concentrações. Há aproximadamente um século, Walther Nernst derivou uma equação que relaciona o potencial de redução padrão ($E°$) ao potencial de redução real ($E$) em qualquer

concentração das espécies oxidadas e reduzidas em uma célula viva:

$$E = E^\circ + \frac{RT}{n\mathcal{J}} \ln \frac{[\text{elétron aceptor}]}{[\text{elétron doador}]} \quad (13\text{-}5)$$

onde $R$ e $T$ têm seus significados usuais, $n$ é o número de elétrons transferidos por molécula, e $\mathcal{J}$ é a constante de Faraday (Tabela 13-1). A 298 K (25°C), essa expressão reduz-se a

$$E = E^\circ + \frac{0{,}026\text{V}}{n} \ln \frac{[\text{elétron aceptor}]}{[\text{elétron doador}]} \quad (13\text{-}6)$$

**CONVENÇÃO-CHAVE:** Muitas semirreações de interesse dos bioquímicos envolvem prótons. Como na definição de $\Delta G'^\circ$, os bioquímicos definem o estado-padrão para as reações de oxidação-redução como pH 7 e expressam como potencial de redução padrão transformado, $E'^\circ$, o potencial de redução padrão a pH 7 e 25°C. Por convenção, o $\Delta E'^\circ$ para qualquer reação redox é dado pelo valor de $E'^\circ$ do aceptor de elétrons menos o valor de $E'^\circ$ do doador de elétrons. ■

Os potenciais de redução padrão apresentados na Tabela 13-7 e utilizados ao longo deste livro são valores de $E'^\circ$, sendo assim válidos apenas para sistemas em pH neutro. Cada valor representa a diferença de potencial quando o par conjugado redox, em concentrações de 1 M, 25°C e pH 7, está conectado com o eletrodo-padrão de hidrogênio (pH 0). Note na Tabela 13-7 que, quando o par conjugado $2H^+/H_2$ em pH 7 está conectado com o eletrodo-padrão de hidrogênio (pH 0), os elétrons tendem a fluir partindo da célula com pH 7 para a célula-padrão (pH 0); o valor de $E'^\circ$ para o par $2H^+/H_2$ é −0,414 V.

## Os potenciais de redução padrão podem ser usados para calcular a variação de energia livre

Por que os potenciais de redução são tão úteis para os bioquímicos? Quando os valores de $E$ são determinados para duas semicélulas quaisquer, em relação ao eletrodo-padrão de hidrogênio, também são conhecidos os potenciais de redução de uma semicélula em relação à outra. Assim, é possível predizer o sentido em que os elétrons tenderão a fluir quando as duas semicélulas estão conectadas por um circuito externo ou quando os componentes das duas semicélulas estão presentes na mesma solução. Os elétrons tendem a fluir para a célula com o valor de $E$ mais positivo, e a intensidade dessa tendência é proporcional à diferença no potencial de redução, $\Delta E$. A energia que se torna disponível por esse fluxo de elétrons espontâneo (a variação de energia livre, $\Delta G$, para a reação de oxidação-redução) é proporcional ao $\Delta E$:

$$\Delta G = -n\mathcal{J}\Delta E \quad \text{ou} \quad \Delta G'^\circ = -n\mathcal{J}\Delta E'^\circ \quad (13\text{-}7)$$

onde $n$ é o número de elétrons transferidos na reação. Essa equação permite calcular a variação de energia livre real para qualquer reação de oxidação-redução a partir dos valores de $E'^\circ$ apresentados em uma tabela de potenciais de redução (Tabela 13-7) e das concentrações das espécies envolvidas na reação.

**TABELA 13-7** Potenciais de redução padrão de algumas semirreações de importância biológica

| Semirreação | $E'^\circ$(V) |
|---|---|
| $\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2O$ | 0,816 |
| $Fe^{3+} + e^- \longrightarrow Fe^{2+}$ | 0,771 |
| $NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow NO_2^- + H_2O$ | 0,421 |
| Citocromo $f$ ($Fe^{3+}$) + $e^-$ ⟶ citocromo $f$ ($Fe^{2+}$) | 0,365 |
| $Fe(CN)_6^{3-}$ (ferricianeto) + $e^-$ ⟶ $Fe(CN)_6^{4-}$ | 0,36 |
| Citocromo $a_3$ ($Fe^{3+}$) + $e^-$ ⟶ citocromo $a_3$ ($Fe^{2+}$) | 0,35 |
| $O_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2O_2$ | 0,295 |
| Citocromo $a$ ($Fe^{3+}$) + $e^-$ ⟶ citocromo $a$ ($Fe^{2+}$) | 0,29 |
| Citocromo $c$ ($Fe^{3+}$) + $e^-$ ⟶ citocromo $c$ ($Fe^{2+}$) | 0,254 |
| Citocromo $c_1$ ($Fe^{3+}$) + $e^-$ ⟶ citocromo $c_1$ ($Fe^{2+}$) | 0,22 |
| Citocromo $b$ ($Fe^{3+}$) + $e^-$ ⟶ citocromo $b$ ($Fe^{2+}$) | 0,077 |
| Ubiquinona + $2H^+$ + $2e^-$ ⟶ ubiquinol + $H_2$ | 0,045 |
| Fumarato$^{2-}$ + $2H^+$ + $2e^-$ ⟶ succinato$^{2-}$ | 0,031 |
| $2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2$ (em condições padrão, pH 0) | 0,000 |
| Crotonil-CoA + $2H^+$ + $2e^-$ ⟶ butiril-CoA | −0,015 |
| Oxaloacetato$^{2-}$ + $2H^+$ + $2e^-$ ⟶ malato$^{2-}$ | −0,166 |
| Piruvato$^-$ + $2H^+$ + $2e^-$ ⟶ lactato$^-$ | −0,185 |
| Acetaldeído + $2H^+$ + $2e^-$ ⟶ etanol | −0,197 |
| FAD+ $2H^+$ + $2e^-$ ⟶ $FADH_2$ | −0,219* |
| Glutationa + $2H^+$ + $2e^-$ ⟶ 2 glutationas reduzidas | −0,23 |
| $S + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2S$ | −0,243 |
| Ácido lipoico + $2H^+$ + $2e^-$ ⟶ ácido di-hidrolipoico | −0,29 |
| $NAD^+$ + $2H^+$ + $2e^-$ ⟶ NADH | −0,320 |
| $NADP^+$ + $H^+$ + $2e^-$ ⟶ NADPH | −0,324 |
| Acetoacetato + $2H^+$ + $2e^-$ ⟶ $\beta$-hidroxibutirato | −0,346 |
| $\alpha$-cetoglutarato + $CO^2$ + $2H^+$ + $2e^-$ ⟶ isocitrato | −0,38 |
| $2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2$ (em pH 7) | −0,414 |
| Ferredoxina ($Fe^{3+}$) + $e^-$ ⟶ ferredoxina ($Fe^{2+}$) | −0,432 |

**Fonte:** Dados extraídos na maior parte de Loach, R. A. (1976), *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology,* 3rd ed. (Fasman, G.D., ed.), *Physical and Chemical Data*, vol. 1, p. 122-130, CRC Press, Boca Raton, FL.
* Este é o valor para FAD livre; FAD ligado a uma flavoproteína específica (p. ex., succinato-desidrogenase) possui um $E'^\circ$ diferente que depende do ambiente em que a proteína está.

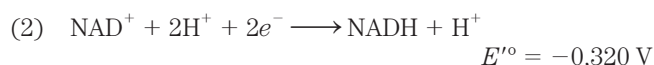
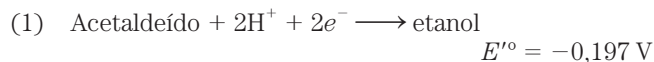
**PROBLEMA RESOLVIDO 13-3** **Cálculo de $\Delta G'^\circ$ e $\Delta G$ de uma reação redox**

Calcule a variação de energia livre padrão, $\Delta G'^\circ$, para a reação em que o acetaldeído é reduzido pelo transportador de elétron biológico NADH:

$$\text{Acetaldeído} + \text{NADH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{etanol} + \text{NAD}^+$$

Em seguida, calcule a variação de energia livre *real*, $\Delta G$, quando a [acetaldeído] e a [NADH] forem de 1 M, e a [etanol] e a [NAD$^+$] forem de 0,1 M. As semirreações relevantes e seus valores de $E'^\circ$ são:

(1) $\text{Acetaldeído} + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{etanol}$ $\quad E'^\circ = -0{,}197 \text{ V}$

(2) $\text{NAD}^+ + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$ $\quad E'^\circ = -0{,}320 \text{ V}$

Lembre-se que, por convenção, $\Delta E'^\circ$ é o valor de $E'^\circ$ do aceptor de elétrons menos o $E'^\circ$ do doador de elétrons.

**Solução:** Como o acetaldeído é o aceptor dos elétrons ($n = 2$) vindos do NADH, $\Delta E'^\circ = -0{,}197 \text{ V} - (-0{,}320 \text{ V}) = 0{,}123$ V. Portanto,

$$\Delta G'^\circ = -n\,\mathcal{F}\,\Delta E'^\circ = -2(96{,}5 \text{ kJ/V}\cdot\text{mol})(0{,}123 \text{ V})$$
$$= -23{,}7 \text{ kJ/mol}$$

Esta é a variação de energia livre para a reação de oxidação-redução a 25°C e pH 7, quando acetaldeído, etanol, NAD$^+$ e NADH estão presentes em concentrações de 1,0 M.

Para calcular o $\Delta G$ quando a [acetaldeído] e a [NADH] forem de 1 M e a [etanol] e a [NAD$^+$] forem de 0,1 M, utilizam-se a Equação 13-4 e a variação de energia livre padrão calculada acima:

$$\Delta G = \Delta G'^\circ + RT \ln \frac{[\text{etanol}]\,[\text{NAD}^+]}{[\text{acetaldeído}]\,[\text{NADH}]}$$
$$= -23{,}7 \text{ kJ/mol} +$$
$$(8{,}315 \text{ J/mol}\cdot\text{K})(298 \text{ K}) \ln \frac{(0{,}100 \text{ M})\,(0{,}100 \text{ M})}{(1{,}00 \text{ M})\,(1{,}00 \text{ M})}$$
$$= -23{,}7 \text{ kJ/mol} + (2{,}48 \text{ J/mol}) \ln 0{,}01$$
$$= -35{,}1 \text{ kJ/mol}$$

Esta é a variação de energia livre real dos pares redox nas concentrações especificadas.

## A oxidação celular da glicose em dióxido de carbono requer transportadores de elétrons especializados

Os princípios da energética da oxidação-redução descritos anteriormente aplicam-se às muitas reações metabólicas que envolvem a transferência de elétrons. Por exemplo, em muitos organismos, a oxidação da glicose fornece energia para a síntese de ATP. A oxidação completa da glicose:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

apresenta um $\Delta G'^\circ$ de $-2.840$ kJ/mol. Esse valor indica uma liberação de energia livre muito maior do que a necessária para a síntese de ATP nas células (50 a 60 kJ/mol; ver Problema Resolvido 13-2). As células não convertem glicose em $CO_2$ em uma única reação com elevada liberação de energia, mas sim por meio de uma série de reações controladas, sendo que algumas delas são oxidações. A energia livre liberada nessas etapas de oxidação é da mesma ordem de magnitude que a necessária para a síntese de ATP a partir de ADP, com alguma energia extra. Os elétrons removidos nessas etapas de oxidação são transferidos para coenzimas especializadas em transportar elétrons, como NAD$^+$ e FAD (descritos a seguir).

## Alguns tipos de coenzimas e proteínas servem como transportadores universais de elétrons

O grande número de enzimas que catalisam as oxidações celulares direciona os elétrons das suas centenas de substratos diferentes para apenas alguns poucos tipos de transportadores de elétrons universais. A redução desses transportadores em processos catabólicos resulta na conversão de energia livre liberada pela oxidação do substrato. NAD, NADP, FMN e FAD são coenzimas solúveis em água que sofrem oxidações e reduções reversíveis em muitas das reações de transferência de elétrons do metabolismo. Os nucleotídeos NAD e NADP movem-se facilmente de uma enzima para outra; os nucleotídeos de flavina FMN e FAD em geral são fortemente ligados às enzimas, chamadas de flavoproteínas, para as quais eles servem de grupos prostéticos. As quinonas lipossolúveis como a ubiquinona e a plastoquinona atuam como transportadores de elétrons e doadores de prótons no meio não aquoso das membranas. As proteínas ferro-enxofre e citocromos, as quais têm grupos prostéticos fortemente ligados e que sofrem oxidação e redução reversíveis, também atuam como transportadores de elétrons em muitas reações de oxidação-redução. Algumas dessas proteínas são hidrossolúveis, enquanto outras são periféricas ou integrais de membrana (ver Figura 11-7).

Arremata este capítulo uma descrição de algumas características químicas das coenzimas nucleotídicas e de algumas das enzimas (desidrogenases e flavoproteínas) que as utilizam. A química de oxidação-redução das quinonas, das proteínas ferro-enxofre e dos citocromos será discutida no Capítulo 19.

## NADH e NADPH atuam com as desidrogenases como transportadores solúveis de elétrons

O dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (NAD, de *nicotinamide adenine dinucleotide*; NAD$^+$ na sua forma oxidada) e seu análogo dinucleotídeo de nicotinamida-adenina-fosfato (NADP, de *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*; NADP$^+$ quando oxidado) são constituídos de dois nucleotídeos cujos grupos fosfato são unidos por uma ligação fosfoanidrido (**Figura 13-24a**). Como o anel de nicotinamida lembra a piridina, algumas vezes esses compostos são chamados de **nucleotídeos de piridina**. A vitamina niacina é a fonte da porção nicotinamida dessas moléculas.

As duas coenzimas sofrem redução reversível do anel de nicotinamida (Figura 13-24). Enquanto uma molécula do substrato sofre oxidação (desidrogenação), liberando

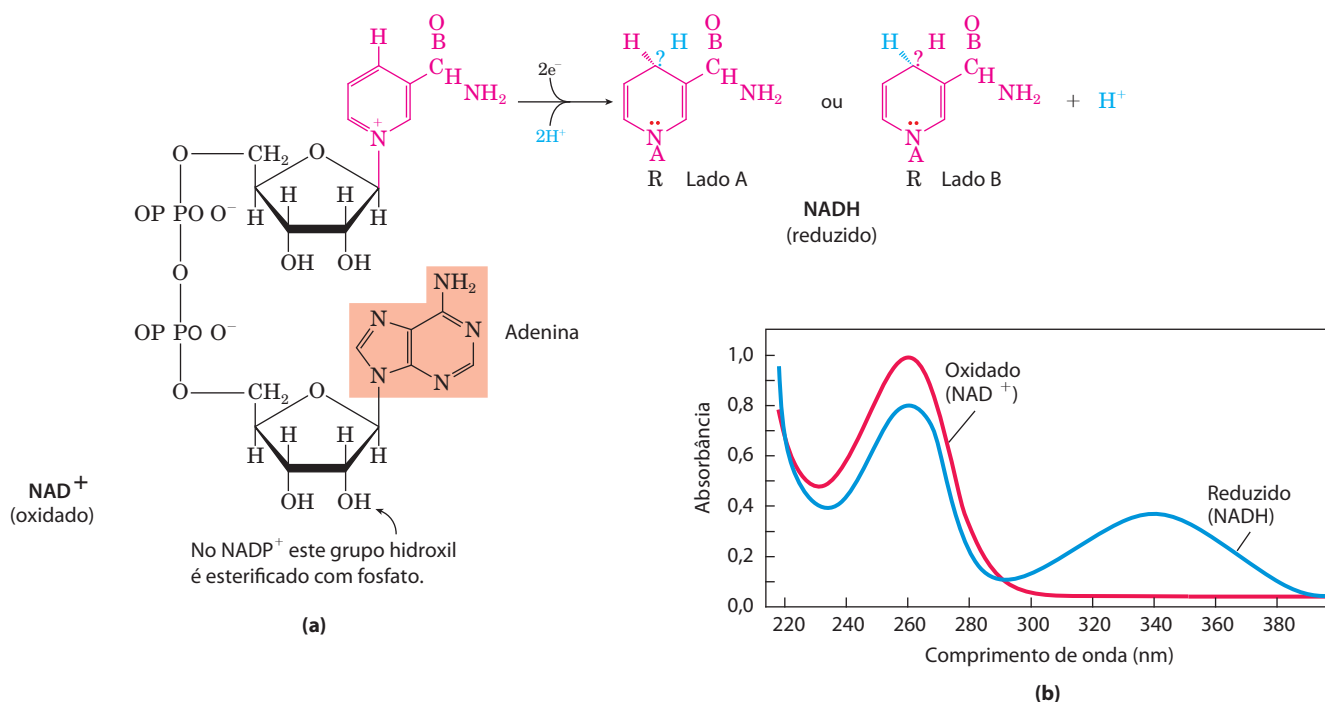
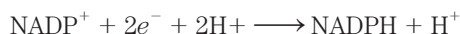



**FIGURA 13-24 NAD e NADP. (a)** O dinucleotídeo de nicotinamida-adenina, $NAD^+$, e seu análogo fosforilado $NADP^+$ sofrem redução a NADH e NADPH, recebendo um íon hidreto (dois elétrons e um próton) de um substrato oxidável. O íon hidreto é adicionado tanto à porção anterior (lado A) quando à porção posterior (lado B) do anel planar da nicotinamida (ver Tabela 13-8). **(b)** Espectro de absorção no UV de $NAD^+$ e NADH. A redução do anel de nicotinamida gera uma banda de absorção ampla, com máximo em 340 nm. A produção de NADH durante uma reação enzimática pode ser convenientemente monitorada observando-se o aparecimento da banda de absorção em 340 nm (coeficiente de extinção molar: $\varepsilon_{340} = 6.200\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

dois átomos de hidrogênio, a forma oxidada do nucleotídeo ($NAD^+$ ou $NADP^+$) recebe um íon hidreto (:$H^-$, o equivalente a um próton e dois elétrons) e é reduzida (a NADH ou NADPH). O segundo próton retirado do substrato é liberado para o solvente aquoso. As semirreações para esses cofatores nucleotídicos são

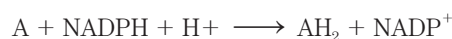
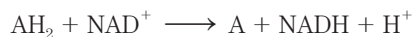
$$NAD^+ + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow NADH + H^+$$

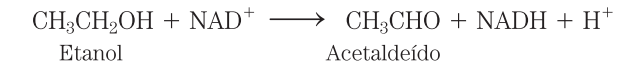
$$NADP^+ + 2e^- + 2H+ \longrightarrow NADPH + H^+$$

A redução de $NAD^+$ ou $NADP^+$ converte o anel benzenoide da porção nicotinamida (com uma carga positiva fixa no nitrogênio do anel) na forma quinoide (nitrogênio sem carga). Os nucleotídeos reduzidos absorvem luz a 340 nm, mas as formas oxidadas não (Figura 13-24b); essa diferença na absorção é utilizada pelos bioquímicos para analisar reações envolvendo essas coenzimas. Note que o sinal positivo nas abreviações $NAD^+$ e $NADP^+$ não indica a carga líquida dessas moléculas (na realidade, ambas são negativamente carregadas), mas sim que o anel de nicotinamida está em sua forma oxidada, com uma carga positiva no átomo de nitrogênio. Nas abreviações NADH e NADPH, o "H" indica o íon hidreto adicionado. Para referir-se a esses nucleotídeos sem especificar seu estado de oxidação, utilizam-se NAD e NADP.

A concentração total de $NAD^+$ e NADH na maioria dos tecidos é de cerca de $10^{-5}$ M; a de $NADP^+$ + NADPH é em torno de $10^{-6}$ M. Em muitas células e tecidos, a relação entre $NAD^+$ (oxidado) e NADH (reduzido) é elevada, favorecendo a transferência do íon hidreto de um substrato *para* o $NAD^+$, formando NADH. Por outro lado, NADPH geralmente está presente em maior concentração que $NADP^+$, favorecendo a transferência do íon hidreto *do* NADPH para um substrato. Isso reflete as funções metabólicas especializadas das duas coenzimas: $NAD^+$ geralmente atua em oxidações – como parte de uma reação catabólica; NADPH é a coenzima comum em reduções – quase sempre como parte de uma reação anabólica. Algumas enzimas são capazes de utilizar ambas as coenzimas, mas a maioria demonstra uma forte preferência por uma em relação à outra. Além disso, os processos nos quais esses dois cofatores atuam são segregados em células eucarióticas: por exemplo, a oxidação de combustíveis como piruvato, ácidos graxos e $\alpha$-cetoácidos derivados dos aminoácidos ocorre na matriz mitocondrial, enquanto os processos biossintéticos redutores, como a síntese de ácidos graxos, ocorrem no citosol. Essa especialização funcional e de localização permite que a célula mantenha dois grupos distintos de transportadores de elétrons com duas funções também distintas.

São conhecidas mais de 200 enzimas que catalisam reações em que $NAD^+$ (ou $NADP^+$) recebem um íon hidreto de um substrato reduzido, ou reações em que NADPH (ou NADH) doam um íon hidreto a um substrato oxidado. As reações gerais são:

$$AH_2 + NAD^+ \longrightarrow A + NADH + H^+$$

$$A + NADPH + H+ \longrightarrow AH_2 + NADP^+$$

nas quais $AH_2$ é o substrato reduzido, e A é o substrato oxidado. A nomenclatura geral para as enzimas desse tipo é **oxidorredutase**, também comumente chamadas de desidrogenases. Por exemplo, a álcool-desidrogenase catalisa a primeira etapa do catabolismo do etanol, em que o etanol é oxidado a acetaldeído:

$$\underset{\text{Etanol}}{CH_3CH_2OH} + NAD^+ \longrightarrow \underset{\text{Acetaldeído}}{CH_3CHO} + NADH + H^+$$

Note que um dos átomos de carbono do etanol perdeu um hidrogênio; o composto foi oxidado de álcool a aldeído (verifique novamente na Figura 13-22 os estados de oxidação do carbono).

Quando $NAD^+$ ou $NADP^+$ estiver reduzido, em princípio o íon hidreto poderia ser transferido para qualquer um dos lados do anel de nicotinamida: para a parte da frente (lado A) ou para a parte de trás (lado B), como representado na Figura 13-24a. Estudos com substratos marcados isotopicamente demonstraram que uma dada enzima pode catalisar transferências do tipo A ou do tipo B, mas nunca ambas. Por exemplo, a álcool-desidrogenase de leveduras e a lactato-desidrogenase de coração de vertebrados transferem um íon hidreto para o (ou removem um íon hidreto do) lado A do anel de nicotinamida; elas são classificadas como desidrogenases do tipo A, para distingui-las de outro grupo de enzimas que transferem um íon hidreto para o (ou removem um íon hidreto do) lado B do anel de nicotinamida (Tabela 13-8). A especificidade por um lado ou por outro pode ser muito expressiva; por exemplo, a lactato-desidrogenase prefere o lado A, por um fator de $5 \times 10^7$! Os princípios para essa preferência têm como base a posição exata dos grupos enzimáticos envolvidos na ligação de hidrogênio com o grupo $—CONH_2$ da nicotinamida.

A maioria das desidrogenases que utilizam NAD ou NADP liga o cofator em um domínio proteico conservado chamado de estrutura de Rossmann (de Michael Rossmann, que deduziu a estrutura da lactato-desidrogenase e foi o primeiro a descrever esse motivo estrutural). A estrutura de Rossmann consiste, geralmente, em uma folha $\beta$ com seis fitas paralelas e quatro hélices $\alpha$ associadas (**Figura 13-25**).

(a)

(b)

**FIGURA 13-25 A estrutura de Rossmann.** Este motivo estrutural é encontrado no sítio de ligação a NAD de muitas desidrogenases. **(a)** Consiste em um par de motivos estruturalmente semelhantes (apenas um deles está mostrado aqui), cada um contendo três folhas $\beta$ paralelas e duas hélices $\alpha$ ($\beta$-$\alpha$-$\beta$-$\alpha$-$\beta$). **(b)** Domínio de ligação ao nucleotídeo da enzima lactato-desidrogenase (derivado do PDB ID 3LDH) com NAD (estrutura em esfera-e-bastão) ligado, em uma conformação estendida, por ligações de hidrogênio e pontes salinas aos motivos $\beta$-$\alpha$-$\beta$-$\alpha$-$\beta$ pareados da estrutura de Rossmann (sombras em vermelho e azul).

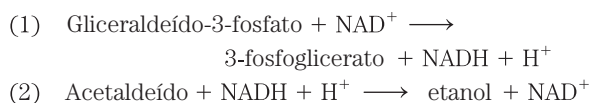
A associação entre a desidrogenase e NAD ou NADP é relativamente fraca; a coenzima difunde-se facilmente de uma enzima para a outra, atuando como transportador hidrossolúvel de elétrons de um metabólito para outro. Por

**TABELA 13-8** Estereoespecificidade das desidrogenases que utilizam $NAD^+$ ou $NADP^+$ como coenzimas

| Enzima | Coenzima | Especificidade estereoquímica para o anel de nicotinamida (A e B) | Página do texto |
|---|---|---|---|
| Isocitrato-desidrogenase | $NAD^+$ | A | 643 |
| $\alpha$-Cetoglutarato-desidrogenase | $NAD^+$ | B | 644 |
| Glicose-6-fosfato-desidrogenase | $NADP^+$ | B | 577 |
| Malato-desidrogenase | $NAD^+$ | A | 647 |
| Glutamato-desidrogenase | $NAD^+$ ou $NADP^+$ | B | 702 |
| Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase | $NAD^+$ | B | 553 |
| Lactato-desidrogenase | $NAD^+$ | A | 563 |
| Álcool-desidrogenase | $NAD^+$ | A | 565 |

exemplo, na produção de álcool durante a fermentação da glicose pelas células de leveduras, um íon hidreto é removido do gliceraldeído-3-fosfato por uma enzima (a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, uma enzima tipo B) e transferido para $NAD^+$. O NADH produzido deixa a superfície da enzima e difunde-se para outra enzima (a álcool-desidrogenase, uma enzima tipo A), que transfere um íon hidreto para o acetaldeído, produzindo etanol:

(1) Gliceraldeído-3-fosfato + $NAD^+ \longrightarrow$ 3-fosfoglicerato + NADH + $H^+$

(2) Acetaldeído + NADH + $H^+ \longrightarrow$ etanol + $NAD^+$

*Soma:* Gliceraldeído-3-fosfato + acetaldeído $\longrightarrow$ 3 fosfoglicerato + etanol

Note que na reação global não existe produção ou consumo líquido de $NAD^+$ ou NADH; as coenzimas atuam cataliticamente e são repetidamente recicladas sem variação líquida na concentração de $NAD^+$ + NADH.

## A deficiência de niacina na dieta, a forma vitamínica de NAD e NADP, causa pelagra

Como mencionado no Capítulo 6, e ainda a ser esmiuçado nos capítulos seguintes, a maioria das coenzimas é derivada de substâncias chamadas de vitaminas. Os anéis semelhantes à piridina de NAD e NADP são derivados da vitamina **niacina** (ácido nicotínico; **Figura 13-26**), sintetizada a partir do triptofano. Os humanos geralmente são incapazes de sintetizar quantidades suficientes de niacina, em especial as pessoas com dieta pobre em triptofano (p. ex., o milho tem baixo conteúdo de triptofano). A deficiência de niacina, que afeta todas as desidrogenases dependentes de NAD(P), causa uma patologia humana grave chamada de pelagra ("pele áspera", em italiano) e uma doença relacionada, em caninos, chamada de língua negra. Essa patologia é caracterizada pelos "três D": dermatite, diarreia e demência, em muitos casos, seguidas de morte. Há um século, a pelagra era uma doença comum entre humanos; no sul dos Estados Unidos, onde o milho era a base da dieta, aproximadamente 100.000 pessoas foram afetadas e em torno de 10.000 morreram em razão dessa doença, entre 1912 e 1916. Em 1920, Joseph Goldberger demonstrou que a pelagra é causada por uma deficiência na dieta, e em 1937, Frank Strong, D. Wayne Woolley e Conrad Elvehjem identificaram a niacina como o agente curativo para a língua negra. A suplementação da dieta humana com esse produto de baixo custo erradicou a pelagra nas populações do mundo desenvolvido, com uma exceção significativa: as pessoas que sofrem de alcoolismo, ou as que ingerem quantidades significativas de álcool. Nesses indivíduos, a absorção intestinal de niacina é muito reduzida, e as necessidades calóricas com frequência são supridas pelo álcool contido nas bebidas destiladas, praticamente destituídas de vitaminas, inclusive niacina. Em algumas partes do mundo, incluindo o Deccan Plateau na Índia, a pelagra ainda ocorre na população em geral, especialmente entre pessoas que vivem na pobreza. ■

Frank Strong, 1908-1993

D. Wayne Woolley, 1914-1966

Conrad Elvehjem, 1901-1962

Niacina (ácido nicotínico) — Nicotina — Nicotinamida — Triptofano

**FIGURA 13-26 Niacina (ácido nicotínico) e seu derivado nicotinamida.** O precursor biossintético desses compostos é o triptofano. No laboratório, o ácido nicotínico foi produzido, pela primeira vez, por oxidação do produto natural, a nicotina – daí seu nome. Tanto o ácido nicotínico quanto a nicotinamida são capazes de curar a pelagra, mas a nicotina (do cigarro ou de outras fontes) não tem atividade curativa.

## Os nucleotídeos de flavina são fortemente ligados às flavoproteínas

As **flavoproteínas** (Tabela 13-9) são enzimas que catalisam reações de oxidação-redução utilizando como coenzima tanto os mononucleotídeos de flavina (FMN, de *flavin mononucleotides*) quanto os dinucleotídeos de flavina-adenina (FAD, de *flavin adenine dinucleotides*) (**Figura 13-27**). Essas coenzimas, os **nucleotídeos de flavina**, são derivadas da vitamina riboflavina. A estrutura de anéis fusionados dos nucleotídeos de flavina (anel de isoaloxazina) sofre redução reversível, recebendo um ou dois elétrons na forma de um ou dois átomos de hidrogênio (cada átomo: um elétron mais um próton) de um substrato reduzido. As formas totalmente reduzidas são abreviadas $FADH_2$ e $FMNH_2$. Quando um nucleotídeo de flavina totalmente oxidado recebe apenas um elétron (um átomo de hidrogênio), é produzida a forma semiquinona do anel de isoaloxazina, abreviado como $FADH^{\bullet}$ e $FMNH^{\bullet}$. Como os nucleotídeos de flavina possuem características químicas ligeiramente diferentes daquelas das coenzimas nicotinamidas – a capacidade de participar

**TABELA 13-9** Algumas enzimas (flavoproteínas) que utilizam coenzimas de nucleotídeos de flavina

| Enzima | Nucleotídeo de flavina | Página do texto |
|---|---|---|
| Acil-CoA-desidrogenase | FAD | 673 |
| Di-hidrolipoil-desidrogenase | FAD | 637 |
| Succinato-desidrogenase | FAD | 646 |
| Glicerol-3-fosfato-desidrogenase | FAD | 759 |
| Tiorredoxina-redutase | FAD | 917 |
| NADH-desidrogenase (Complexo I) | FMN | 738–739 |
| Glicolato-oxidase | FMN | 813 |

na transferência de um ou dois elétrons – as flavoproteínas estão envolvidas em uma diversidade maior de reações do que as desidrogenases ligadas a NAD(P).

Assim como as coenzimas nicotinamidas (Figura 13-24), a redução dos nucleotídeos de flavina é acompanhada por uma mudança da sua principal banda de absorção de luz (mais uma vez útil aos bioquímicos que desejam monitorar reações envolvendo essas coenzimas). As flavoproteínas completamente reduzidas (que receberam dois elétrons) geralmente possuem um máximo de absorção em 360 nm. Quando parcialmente reduzidas (um elétron), elas apresentam outro máximo de absorção em cerca de 450 nm; quando totalmente oxidadas, a flavina tem um máximo em 370 nm e 440 nm.

Na maioria das flavoproteínas, o nucleotídeo de flavina encontra-se fortemente ligado à proteína, e em algumas enzimas, como na succinato-desidrogenase, ele está ligado covalentemente. Essas coenzimas fortemente ligadas são apropriadamente chamadas de grupos prostéticos. Elas não transferem elétrons por difusão de uma enzima para a outra; em vez disso, elas fornecem um meio pelo qual as flavoproteínas podem reter os elétrons temporariamente enquanto catalisam a transferência do elétron de um substrato reduzido para um aceptor de elétrons. Uma característica importante das flavoproteínas é a variabilidade do potencial de redução padrão ($E'°$) do nucleotídeo de flavina ligado. A forte associação entre a enzima e o grupo prostético confere ao anel de flavina um potencial de redução típico da flavoproteína em particular, algumas vezes bastante diferente do potencial de redução do nucleotídeo de flavina livre. O FAD ligado à succinato-desidrogenase, por exemplo, tem um valor de $E'°$ próximo de 0,0 V, comparado com −0,219 V para o FAD livre; o valor de $E'°$ para outras flavoproteínas varia de −0,40 V a +0,06 V. As flavoproteínas frequentemente são muito complexas; algumas possuem, além de um nucleotídeo de flavina, íons inorgânicos fortemente ligados (p. ex., ferro ou molibdênio) capazes de participar da transferência de elétrons.

Certas flavoproteínas têm funções bastante diferentes, como receptores de luz. Os **criptocromos**, família de flavoproteínas amplamente distribuídas nos filos eucarióticos, são responsáveis por mediar os efeitos da luz azul sobre o desenvolvimento das plantas e, nos mamíferos, os efeitos da luz sobre o ritmo circadiano (oscilações fisiológicas e bio-

Anel de isoaloxazina

FMN

FAD

Dinucleotídeo de flavina-adenina (FAD) e mononucleotídeo de flavina (FMN)

FADH• (FMNH•) (semiquinona)

$FADH_2$ ($FMNH_2$) completamente reduzido

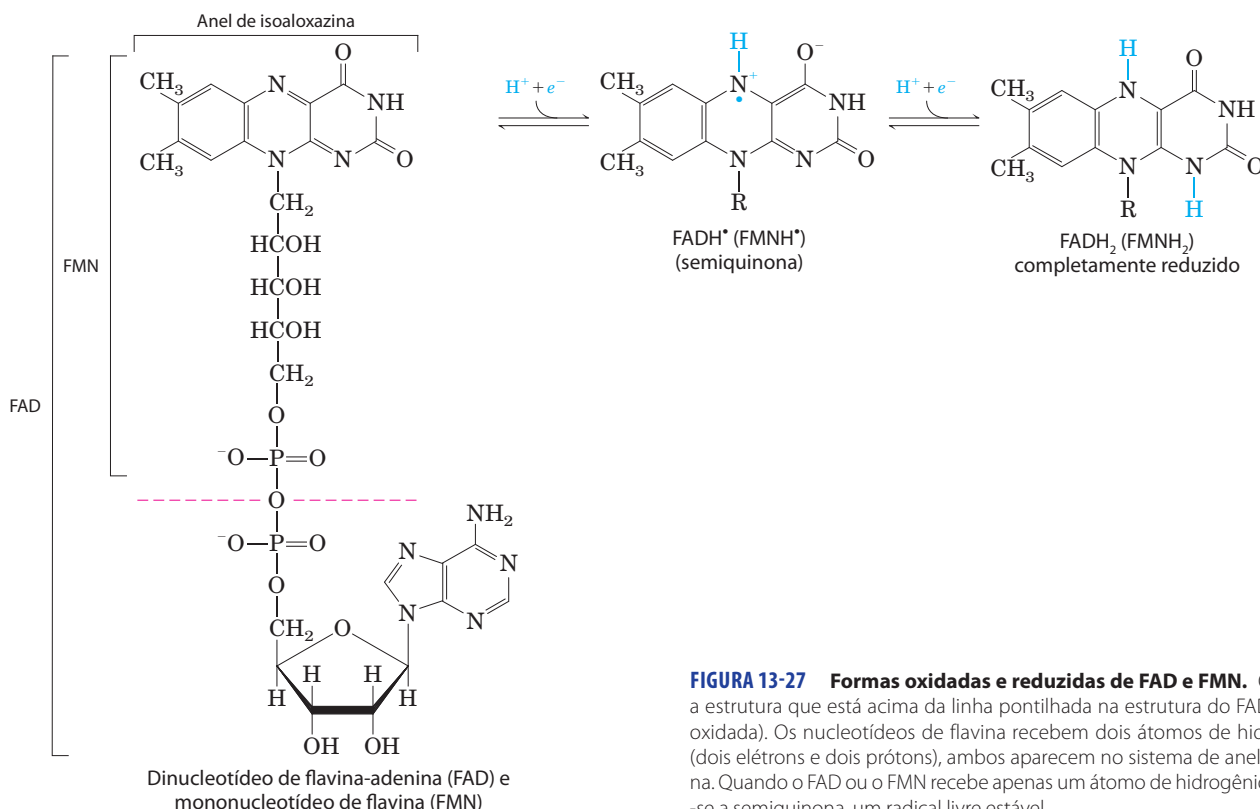



**FIGURA 13-27 Formas oxidadas e reduzidas de FAD e FMN.** O FMN é a estrutura que está acima da linha pontilhada na estrutura do FAD (forma oxidada). Os nucleotídeos de flavina recebem dois átomos de hidrogênio (dois elétrons e dois prótons), ambos aparecem no sistema de anel da flavina. Quando o FAD ou o FMN recebe apenas um átomo de hidrogênio, forma-se a semiquinona, um radical livre estável.

químicas em um período de 24 horas). Os criptocromos são homólogos de outra família de flavoproteínas, as fotoliases. Encontradas em bactérias e em eucariotos, as **fotoliases** utilizam a energia absorvida da luz para reparar defeitos químicos no DNA.

No Capítulo 19, serão estudadas as funções das flavoproteínas como transportadoras de elétrons, bem como suas funções na fosforilação oxidativa (em cloroplastos). As reações da fotoliase serão descritas no Capítulo 25.

## RESUMO 13.4 Reações biológicas de oxidação-redução

- Em muitos organismos, o processo central de conservação de energia é a oxidação gradual da glicose em $CO_2$, de forma que parte da energia de oxidação é conservada no ATP à medida que os elétrons passam para o $O_2$.
- As reações biológicas de oxidação-redução podem ser descritas em termos de duas semirreações, cada uma com um potencial de redução padrão, $E'^{\circ}$, característico.
- Quando duas semicélulas eletroquímicas estão conectadas, cada uma contendo os componentes de uma semirreação, os elétrons tendem a fluir para a semicélula com o maior potencial de redução. A força dessa tendência é proporcional à diferença entre os dois potenciais de redução ($\Delta E$), sendo uma função das concentrações das espécies oxidadas e reduzidas.
- A variação de energia livre padrão para uma reação de oxidação-redução é diretamente proporcional à diferença dos potenciais de redução padrão das duas semicélulas: $\Delta G'^{\circ} = -n \mathcal{F} \Delta E'^{\circ}$.
- Muitas reações biológicas de oxidação são desidrogenações em que um ou dois átomos de hidrogênio ($H^+ + e^-$) são transferidos de um substrato para um aceptor de hidrogênio. Reações de oxidação-redução em células vivas envolvem transportadores especializados de elétrons.
- NAD e NADP são as coenzimas livremente difusíveis de muitas desidrogenases. Tanto $NAD^+$ quanto $NADP^+$ aceitam dois elétrons e um próton.
- FAD e FMN, os nucleotídeos de flavina, atuam como grupos prostéticos fortemente ligados às flavoproteínas. Eles são capazes de aceitar um ou dois elétrons e um ou dois prótons. As flavoproteínas também servem como receptores de luz em criptocromos e fotoliases.

## Termos-chave

*Os termos em negrito estão definidos no glossário.*



## Leituras adicionais

### Bioenergética e termodinâmica

**Atkins, P.W.** (1984) *The Second Law*, Scientific American Books, Inc., New York.
Discussão bem ilustrada e elementar da segunda lei e suas implicações.

**Atkinson, D.E.** (1977) *Cellular Energy Metabolism and Its Regulation*, Academic Press, Inc., New York.
Clássico tratamento do papel de ATP, ADP e AMP no controle da taxa do metabolismo.

**Bergethon, P.R.** (1998) *The Physical Basis of Biochemistry*, Springer Verlag, New York.
Os capítulos 11 ao 13 deste livro, e os livros de Tinoco e colaboradores e van Holde e colaboradores (listados na sequência), são excelentes referências gerais sobre bioquímica física, com boas discussões das aplicações da termodinâmica em bioquímica.

**Edsall, J.T. & Gutfreund, H.** (1983) *Biothermodynamics: The Study of Biochemical Processes at Equilibrium*, John Wiley & Sons, Inc., New York.

**Hammes, G.** (2000) *Thermodynamics and Kinetics for the Biological Sciences*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
Claramente escrita, bem ilustrada com exemplos e problemas excelentes.

**Harold, F.M.** (1986) *The Vital Force: A Study of Bioenergetics*, W. H. Freeman and Company, New York.
Bela e clara discussão sobre a termodinâmica em processos biológicos.

**Harris, D.A.** (1995) *Bioenergetics at a Glance*, Blackwell Science, Oxford.

**Haynie, D.T.** *Biological Thermodynamics, Cambridge University Press, Cambridge.*

**Loewenstein, W.R.** *The Touchstone of Life: Molecular Information, Cell Communication, and the Foundations of Life, Oxford University Press, New York.*
Discussão primorosamente escrita sobre relação entre a entropia e a informação.

**Nicholls, D.G. & Ferguson, S.J.** (2002) *Bioenergetics 3*, Academic Press, Inc., New York.
Discussão clara, bem ilustrada, de nível intermediário sobre a teoria da bioenergética e os mecanismos das transduções de energia.

**Tinoco, I., Jr., Sauer, K., Wang, J.C., & Puglisi, J.D.** (2002) *Physical Chemistry: Principles and Applications in Biological Sciences*, 4th ed, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, NJ.
Os capítulos 2 ao 5 envolvem termodinâmica.

**van Holde, K.E., Johnson, C., & Ho, P.S.** (2006) *Principles of Physical Biochemistry*, 2nd ed, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, NJ.
Os capítulos 2 e 3 são especialmente relevantes.

### Lógica química e reações bioquímicas comuns

**Frey, P.A.** (2001) Radical mechanisms of enzymatic catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 121–148.
Uma pesquisa muito útil sobre as reações que ocorrem via radical livre.

**Frey, P.A. & Hegeman, A.D.** (2006) *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Oxford University Press, New York.
Uma fonte oficial e atualizada sobre as reações que ocorrem em sistemas vivos.

**Gutteridge, A. & Thornton, J.M.** (2005) Understanding nature's catalytic toolkit. *Trends Biochem. Sci.* **11**, 622–629.

**Kraut, D.A., Carroll, K.S., & Herschlag, D.** (2003) Challenges in enzyme mechanism and energetics. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 517–571.
Um bom resumo sobre os princípios da catálise enzimática, tal como atualmente entendida e o que ainda não é compreendido.

### Transferência de grupos fosforil e ATP

**Alberty, R.A.** (1994) Biochemical thermodynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **1207**, 1–11.
Explica a diferença entre as equações bioquímicas e químicas, além do cálculo e do significado das propriedades termodinâmicas transformadas para o ATP e outros campostos fosforilados.

**Bridger, W.A. & Henderson, J.F.** (1983) *Cell ATP*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
A química do ATP, seu papel na regulação do metabolismo e suas funções catabólicas e anabólicas.

**Brown, M.R.W. & Kornberg, A.** (2004) Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 16,085–16,087.

**Fraley, C.D., Rashid, M.H., Lee, S.S.K., Gottschalk, R., Harrison, J., Wood, P.J., Brown, M.R.W., & Kornberg, A.** (2007) A polyphosphate kinase 1 (ppk1) mutant of *Pseudomonas aeruginosa* exhibits multiple ultrastructural and functional defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 3526–3531.

**Frey, P.A. & Arabshahi, A.** (1995) Standard free-energy change for the hydrolysis of the α-β-phosphoanhydride bridge in ATP. *Biochemistry* **34**, 11,307–11,310.

**Hanson, R.W.** (1989) The role of ATP in metabolism. *Biochem. Educ.* **17**, 86–92.
Resumo excelente da química e da biologia do ATP.

**Kalckar, H.M.** (1991) Fifty years of biological research: from oxidative phosphorylation to energy requiring transport regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 1–37.
Uma discussão em nível intermediário sobre a história dos estudos do ATP, em que o autor era o personagem principal.

**Kornberg, A.** (1999) Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 89–125.

**Lipmann, F.** (1941) Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Adv. Enzymol.* **11**, 99–162.
Clássica discussão sobre o papel dos compostos de fosfato de alta-energia na biologia.

**Pullman, B. & Pullman, A.** (1960) Electronic structure of energy-rich phosphates. *Radiat. Res.,* Suppl. 2, 160–181.
Discussão avançada sobre a química do ATP e outros compostos ricos em energia.

**Rees, D.C. & Howard, J.B.** (1999) Structural bioenergetics and energy transduction mechanisms. *J. Mol. Biol.* **293**, 343–350.
Discussão sobre as bases estruturais para o acoplamento eficiente de dois processos energéticos através de mudanças em estados conformacionais.

**Veech, R.L., Lawson, J.W.R., Cornell, N.W., & Krebs, H.A.** (1979) Cytosolic phosphorylation potential. *J. Biol. Chem.* **254**, 6538–6547.
Determinação experimental das concentrações de ATP, de ADP e de $P_i$ no cérebro, no músculo e no fígado, e também uma discussão sobre as dificuldades em determinar a real variação de energia para a síntese de ATP nas células.

**Westheimer, F.H.** (1987) Why nature chose phosphates. *Science* **235**, 1173–1178.
Uma descrição química sobre a adequação química única dos ésteres de fosfato e dos anidridos nas reações metabólicas.

### Reações biológicas de oxidação-redução

**Cashmore, A.R., Jarillo, J.A., Wu, Y.J., & Liu, D.** (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* **284**, 760–765.

**Dolphin, D., Avramovic, O., & Poulson, R. (eds).** (1987) *Pyridine Nucleotide Coenzymes: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
Excelente coleção com dois volumes de revisões oficiais. Entre as mais úteis estão os capítulos do Kaplan, Westheimer, Veech e Ohno e Ushio.

**Fraaije, M.W. & Mattevi, A.** (2000) Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 126–132.

**Hosler, J.P., Ferguson-Miller, S., & Mills, D.S.** (2006) Energy transduction: proton transfer through the respiratory complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 165–187.

**Massey, V.** (1994) Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *J. Biol. Chem.* **269**, 22,459–22,462.
Breve revisão sobre a química das interações entre flavina-oxigênio em flavoproteínas.

**Rees, D.C.** (2002) Great metalloclusters in enzymology. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 221–246.
Uma revisão avançada sobre os tipos de aglomerados de íons metálicos encontrados em enzimas e seus modos de ação.

**Roehm, K.-H.** (2001) Electron carriers: proteins and cofactors in oxidative phosphorylation. In *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Inc./Wiley InterScience, www.els.net.
Uma boa visão global sobre as diferentes classes de transportadores de elétrons que participam da respiração.

**Williams, R.E. & Bruce, N.C.** (2002) New uses for an old enzyme—the old yellow enzyme family of flavoenzymes. *Microbiology* **148**, 1607–1614.

## Problemas

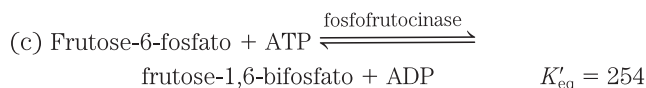
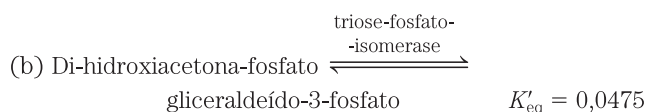
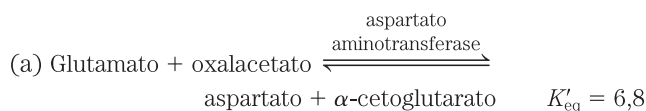
**1. Variações na entropia durante o desenvolvimento do ovo.** Considere um sistema consistindo em um ovo em uma incubadora. A clara e a gema do ovo contêm proteínas, carboidratos e lipídeos. Se fertilizado, o ovo é transformado de uma única célula em um organismo complexo. Discuta esse processo irreversível em termos da variação de entropia do sistema, do meio e do universo. Não esqueça de definir primeiro, claramente, o sistema e o meio.

**2. Cálculo do $\Delta G'^\circ$ de uma constante de equilíbrio.** Calcule a variação de energia livre padrão para cada uma das se-

guintes reações enzimáticas, metabolicamente importantes, utilizando as constantes de equilíbrio dadas para as reações a 25°C e pH 7,0.

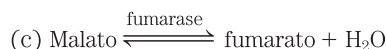
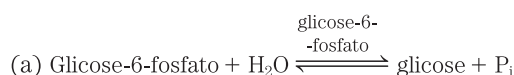
(a) Glutamato + oxalacetato $\xrightleftharpoons{\text{aspartato aminotransferase}}$ aspartato + $\alpha$-cetoglutarato $\quad K'_{eq} = 6{,}8$

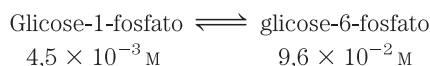
(b) Di-hidroxiacetona-fosfato $\xrightleftharpoons{\text{triose-fosfato-isomerase}}$ gliceraldeído-3-fosfato $\quad K'_{eq} = 0{,}0475$

(c) Frutose-6-fosfato + ATP $\xrightleftharpoons{\text{fosfofrutocinase}}$ frutose-1,6-bifosfato + ADP $\quad K'_{eq} = 254$

**3. Cálculo da constante de equilíbrio a partir do $\Delta G'^\circ$.** Calcule a constante de equilíbrio $K'_{eq}$ para cada uma das reações seguintes a pH 7,0 e 25°C, usando os valores de $\Delta G'^\circ$ na Tabela 13-4.

(a) Glicose-6-fosfato + $H_2O$ $\xrightleftharpoons{\text{glicose-6-fosfato}}$ glicose + $P_i$

(b) Lactose + $H_2O$ $\xrightleftharpoons{\beta\text{-galactosidase}}$ glicose + galactose

(c) Malato $\xrightleftharpoons{\text{fumarase}}$ fumarato + $H_2O$

**4. Determinação experimental de $K'_{eq}$ e $\Delta G'^\circ$.** Se uma solução de glicose-1-fosfato de 0,1 M a 25°C é incubada com uma quantidade catalítica de fosfoglicomutase, a glicose-1-fosfato é transformada em glicose-6-fosfato. No equilíbrio, as concentrações dos componentes da reação são

$$\underset{4{,}5 \times 10^{-3}\ \text{M}}{\text{Glicose-1-fosfato}} \rightleftharpoons \underset{9{,}6 \times 10^{-2}\ \text{M}}{\text{glicose-6-fosfato}}$$

Calcule $K'_{eq}$ e $\Delta G'^\circ$ para essa reação.

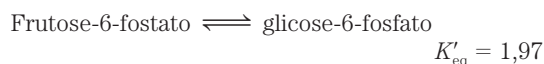
**5. Determinação experimental de $\Delta G'^\circ$ para a hidrólise de ATP.** Uma medida direta da variação da energia livre padrão associada com a hidrólise de ATP é tecnicamente difícil, já que é complicado medir com precisão a quantidade mínima de ATP remanescente no equilíbrio. No entanto, o valor de $\Delta G'^\circ$ pode ser calculado indiretamente, a partir das constantes de equilíbrio de duas outras reações enzimáticas com constantes de equilíbrio menos favoráveis:

Glicose-6-fosfato + $H_2O$ $\longrightarrow$ glicose + $P_i$ $\quad K'_{eq} = 270$

ATP + glicose $\longrightarrow$ ADP + glicose-6-fosfato $\quad K'_{eq} = 890$

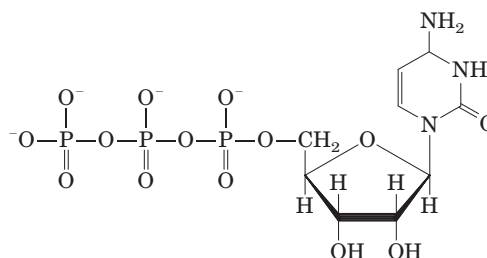
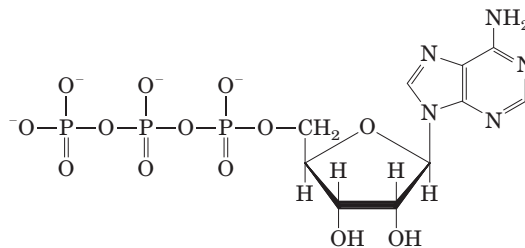
Usando essa informação para as constantes de equilíbrio determinadas a 25°C, calcule a energia livre padrão para a hidrólise de ATP.

**6. Diferença entre $\Delta G'^\circ$ e $\Delta G$.** Considere a seguinte interconversão, que ocorre na glicólise (Capítulo 14):

Frutose-6-fostato $\rightleftharpoons$ glicose-6-fosfato $\quad K'_{eq} = 1{,}97$

(a) Qual é o $\Delta G'^\circ$ para a reação ($K'_{eq}$ medido a 25°C)?

(b) Se a concentração de frutose-6-fosfato é ajustada para 1,5 M e a da glicose-6-fosfato é ajustada para 0,5 M, qual é o $\Delta G$?

(c) Por que $\Delta G'^\circ$ e $\Delta G$ são diferentes?

**7. Energia livre de hidrólise do CTP.** Compare a estrutura do nucleosídeo trifosfato CTP com a estrutura do ATP.

Trifosfato de citidina (CTP)

Trifosfato de adenosina (ATP)

Agora prediga os valores de $K'_{eq}$ e $\Delta G'^\circ$ para a seguinte reação:

$$\text{ATP} + \text{CDP} \longrightarrow \text{ADP} + \text{CTP}$$

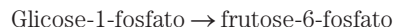
**8. Dependência de $\Delta G$ em relação ao pH.** A energia livre liberada pela hidrólise do ATP em condições-padrão é −30,5 kJ/mol. Se ATP é hidrolisado em condições-padrão, porém em pH 5,0, a energia livre liberada é maior ou menor? Explique. Use o gráfico interativo para explorar essa relação.

**9. O $\Delta G'^\circ$ para reações acopladas.** Glicose-1-fosfato é convertida em frutose-6-fosfato em duas reações sucessivas:

$$\text{Glicose-1-fosfato} \longrightarrow \text{glicose-6-fosfato}$$

$$\text{Glicose-6-fosfato} \longrightarrow \text{frutose-6-fosfato}$$

Usando os valores de $\Delta G'^\circ$ da Tabela 13-4, calcule a constante de equilíbrio, $K'_{eq}$, para a soma das duas reações:

$$\text{Glicose-1-fosfato} \rightarrow \text{frutose-6-fosfato}$$

**10. Efeito da relação [ATP]/[ADP] sobre a energia livre de hidrólise do ATP.** Utilizando a Equação 13-4, construa o gráfico $\Delta G$ contra ln $Q$ (razão da ação das massas) a 25°C para as concentrações de ATP, ADP e $P_i$ dadas na tabela abaixo. $\Delta G'^\circ$ para a reação é −30,5 kJ/mol. Use o resultado do gráfico para explicar por que o metabolismo é regulado para manter alta a razão [ATP]/[ADP].

| | Concentração (mM) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ATP | 5 | 3 | 1 | 0,2 | 5 |
| ADP | 0,2 | 2,2 | 4,2 | 5,0 | 25 |
| $P_i$ | 10 | 12,1 | 14,1 | 14,9 | 10 |

**11. Estratégia para superar reações desfavoráveis: acoplamento químico dependente de ATP.** A fosforilação da glicose a glicose-6-fosfato é a etapa inicial no catabolismo da glicose. A fosforilação direta da glicose por $P_i$ é descrita pela equação

Glicose + $P_i$ $\longrightarrow$ glicose-6-fosfato + $H_2O$ $\quad \Delta G'^\circ = 13{,}8$ kJ/mol

(a) Calcule a constante de equilíbrio para a reação a 37°C. No hepatócito de rato, as concentrações fisiológicas de glicose e $P_i$ são mantidas a 4,8 mM, aproximadamente. Qual é a concentração de equilíbrio de glicose-6-fosfato obtida pela fosforilação direta da glicose por $P_i$? Esta reação representa um passo metabólico aceitável para o catabolismo da glicose? Explique.

(b) Em princípio, pelo menos uma forma de aumentar a concentração de glicose-6-fosfato é direcionar o equilíbrio da reação para a direita elevando as concentrações intracelulares de glicose e $P_i$. Assumindo uma concentração fixa de $P_i$ em 4,8 mM, quão elevada teria que ser a concentração de glicose intracelular para gerar uma concentração de equilíbrio de glicose-6-fosfato de 250 $\mu$M (a concentração fisiológica normal)? Esse caminho seria fisiologicamente aceitável, dado que a solubilidade máxima da glicose é menor que 1 M?

(c) A fosforilação da glicose na célula está acoplada à hidrólise de ATP; isto é, parte da energia livre da hidrólise de ATP é usada para fosforilar a glicose:

(1) Glicose + $P_i \longrightarrow$ glicose-6-fosfato + $H_2O$ $\quad \Delta G'^\circ = 13{,}8$ kJ/mol

(2) ATP + $H_2O \longrightarrow$ ADP + $P_i$ $\quad \Delta G'^\circ = -30{,}5$ kJ/mol

*Soma:* Glicose + ATP $\longrightarrow$ glicose-6-fosfato + ADP

Calcule $K'_{eq}$ a 37°C para a reação global. Para a fosforilação da glicose dependente de ATP, qual é a concentração de glicose necessária para atingir uma concentração intracelular de 250 $\mu$M de glicose-6-fosfato quando as concentrações de ATP e ADP são de 3,38 mM e 1,32 mM, respectivamente? Esse processo de acoplamento produz uma rota adequada, pelo menos em princípio, para a fosforilação da glicose na célula? Explique.

(d) Embora o acoplamento da hidrólise de ATP à fosforilação de glicose faça sentido termodinamicamente, ainda não foi especificado como esse acoplamento ocorre. Dado que o acoplamento requer um intermediário comum, uma rota possível é o uso da hidrólise do ATP para elevar a concentração intracelular de $P_i$ e assim impulsionar a fosforilação desfavorável da glicose por $P_i$. Essa rota é viável? (Pense sobre a solubilidade dos intermediários metabólicos.)

(e) A fosforilação da glicose acoplada ao ATP é catalisada em hepatócitos pela enzima glicocinase. Essa enzima liga ATP e glicose formando um complexo glicose-ATP-enzima, e o grupo fosforil é transferido diretamente do ATP para a glicose. Explique as vantagens dessa rota.

**12. Cálculos de $\Delta G'^\circ$ para as reações acopladas ao ATP.** A partir dos dados na Tabela 13-6, calcule o valor de $\Delta G'^\circ$ para as seguintes reações.

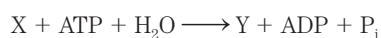
(a) Fosfocreatina + ADP $\longrightarrow$ creatina + ATP

(b) ATP + frutose $\longrightarrow$ ADP + frutose-6-fosfato

**13. Acoplamento da hidrólise de ATP a uma reação desfavorável.** Para explorar as consequências do acoplamento da hidrólise de ATP a uma reação bioquímica termodinamicamente desfavorável, em condições fisiológicas, considere a transformação hipotética X $\rightarrow$ Y, em que $\Delta G'^\circ = 20{,}0$ kJ/mol.

(a) Qual é a razão [Y]/[X] no equilíbrio?

(b) Suponha que X e Y participem de uma sequência de reações durante a hidrólise de ATP em ADP e $P_i$. A reação global é

$$X + ATP + H_2O \longrightarrow Y + ADP + P_i$$

Calcule a relação [Y]/[X] para essa reação no equilíbrio. Assuma que a temperatura é de 25°C e as concentrações no equilíbrio de ATP, ADP e $P_i$ são de 1 M.

(c) Sabe-se que [ATP], [ADP] e [$P_i$] *não* são 1 M em condições fisiológicas. Calcule [Y]/[X] para a reação acoplada ao ATP quando os valores de [ATP], [ADP] e [$P_i$] são aqueles encontrados nos miócitos de ratos (Tabela 13-5).

**14. Cálculos de $\Delta G$ em concentrações fisiológicas.** Calcule o $\Delta G$ real fisiológico para a reação

$$\text{Fosfocreatina} + \text{ADP} \longrightarrow \text{creatina} + \text{ATP}$$

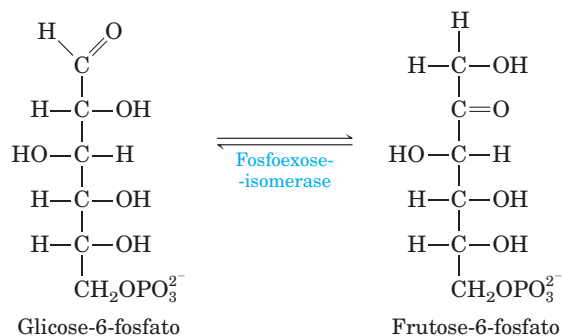
a 37°C, como ocorre no citosol dos neurônios, com 4,7 mM de fosfocreatina, 1,0 mM de creatina, 0,73 mM de ADP e 2,6 mM de ATP.

**15. Energia livre necessária para a síntese de ATP em condições fisiológicas.** No citosol de hepatócitos de ratos, a temperatura é de 37°C e a razão da ação das massas, $Q$, é

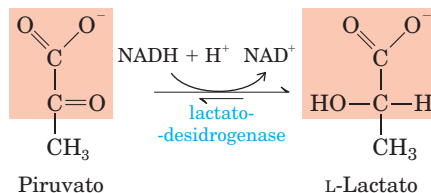
$$\frac{[ATP]}{[ADP][P_i]} = 5{,}33 \times 10^2 \ M^{-1}$$

Calcule a energia livre necessária para a síntese de ATP em um hepatócito de rato.

**16. Lógica química.** Na via glicolítica, um açúcar de seis carbonos (frutose-1,6-bifosfato) é clivado para formar dois açúcares de três carbonos, que sofrem metabolismo adicional (ver Figura 14-6). Nesta via, ocorre isomerização da glicose-6-fosfato a frutose-6-fosfato (mostrada abaixo) dois passos antes da reação de clivagem (o passo seguinte é a fosforilação de frutose-6-fosfato a frutose-1,6-bifosfato [p. 549]).

Glicose-6-fosfato $\rightleftharpoons$ (Fosfoexose-isomerase) Frutose-6-fosfato

O que a isomerização faz a partir de uma perspectiva bioquímica? (Dica: considere o que poderia acontecer se a ligação de clivagem C—C procedesse sem a isomerização.)

**17. Mecanismos de reação enzimática I.** A lactato-desidrogenase é uma das muitas enzimas que necessitam de NADH como coenzima. Ela catalisa a conversão de piruvato em lactato:

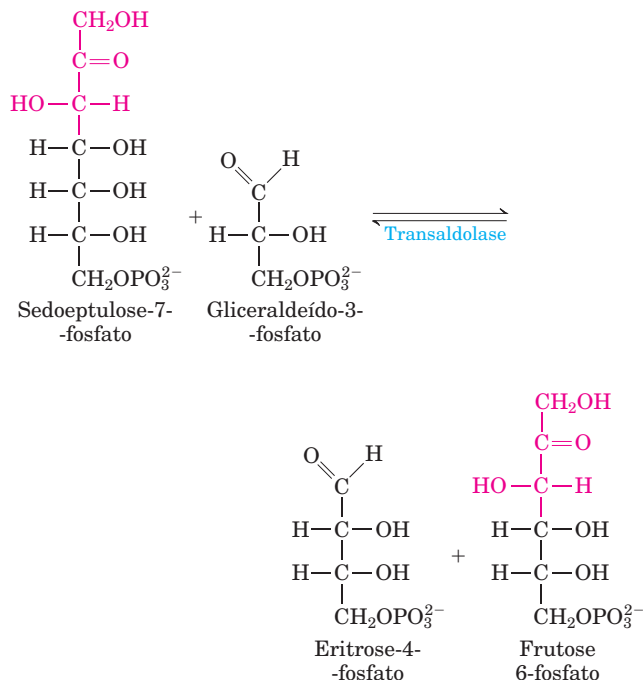
Piruvato + NADH + $H^+$ $\longrightarrow$ (lactato-desidrogenase) L-Lactato + $NAD^+$

Represente o mecanismo dessa reação (mostre setas da trajetória dos elétrons). (Dica: esta é uma reação comum por todo o metabolismo; o mecanismo é semelhante àquele catalisado por outras desidrogenases que usam NADH, como a álcool-desidrogenase.)

**18. Mecanismos de reação enzimática II.** As reações bioquímicas frequentemente parecem mais complicadas do que elas realmente são. Na via das pentoses-fosfato (Capítulo 14), sedoeptulose-7-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato reagem formando eritrose-4-fosfato e frutose-6-fosfato em uma reação catalisada pela transaldolase.

$CH_2OH$ | C=O | HO—C—H | H—C—OH | H—C—OH | H—C—OH | $CH_2OPO_3^{2-}$ + O=C(H) | H—C—OH | $CH_2OPO_3^{2-}$ ⇌ (Transaldolase)

Sedoeptulose-7--fosfato   Gliceraldeído-3--fosfato

O=C(H) | H—C—OH | H—C—OH | $CH_2OPO_3^{2-}$ + $CH_2OH$ | C=O | HO—C—H | H—C—OH | H—C—OH | $CH_2OPO_3^{2-}$

Eritrose-4--fosfato   Frutose 6-fosfato

Represente um mecanismo para essa reação (mostre setas da trajetória dos elétrons). (Dica: olhe mais uma vez as condensações aldólicas, e então considere o nome dessa enzima.)

**19. A utilização diária de ATP por humanos adultos.**

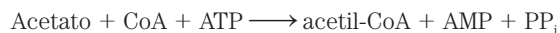
(a) Um total de 30,5 kJ/mol de energia livre é necessário para sintetizar ATP a partir de ADP e $P_i$ quando os reagentes e produtos estão a concentrações de 1 M e a temperatura é de 25°C (estado-padrão). Como as concentrações fisiológicas reais de ATP, ADP e $P_i$ não são de 1 M, e a temperatura é de 37°C, a energia livre necessária para sintetizar ATP em condições fisiológicas é diferente do $\Delta G'^{\circ}$. Calcule a energia livre necessária para sintetizar ATP no hepatócito humano quando as concentrações fisiológicas de ATP, ADP e $P_i$ são de 3,5, 1,5 e 5,0 mM, respectivamente.

(b) Um adulto de 68 kg requer uma ingesta calórica de 2.000 kcal (8.360 kJ) de alimento por dia (24 horas). O alimento é metabolizado e a energia livre é utilizada para sintetizar ATP, que por sua vez fornece energia para o trabalho químico e mecânico diário do corpo. Assumindo que a eficiência de conversão da energia do alimento em ATP é de 50%, calcule a massa de ATP usada por um humano adulto em 24 horas. Qual a porcentagem da massa corporal que esse valor representa?

(c) Embora indivíduos adultos sintetizem uma grande quantidade de ATP diariamente, sua massa corporal, estrutura e composição não varia significativamente durante esse período. Explique essa aparente contradição.

**20. Taxas de reciclagem dos fosfatos γ e β do ATP.** Se uma quantidade pequena de ATP marcado com fósforo radiativo na posição terminal, $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$, for adicionada a um extrato de levedura, cerca de metade da radioatividade do $^{32}P$ é encontrada no $P_i$ em poucos minutos, mas a concentração de ATP permanece inalterada. Explique. Se o mesmo experimento é realizado utilizando ATP marcado com $^{32}P$ na posição central, $[\beta\text{-}^{32}P]ATP$, o $^{32}P$ não aparece em $P_i$ em tão curto período de tempo. Por quê?

**21. A clivagem de ATP em AMP e $PP_i$ durante o metabolismo.** A síntese da forma ativada do acetato (acetil-CoA) é realizada em um processo dependente de ATP:

$$\text{Acetato} + \text{CoA} + \text{ATP} \longrightarrow \text{acetil-CoA} + \text{AMP} + PP_i$$

(a) O $\Delta G'^{\circ}$ para a hidrólise de acetil-CoA em acetato e CoA é −32,2 kJ/mol e o para a hidrólise de ATP em AMP e $PP_i$ é −30,5 kJ/mol. Calcule o $\Delta G'^{\circ}$ para a síntese dependente de ATP de acetil-CoA.

(b) Quase todas as células contêm a enzima pirofosfatase inorgânica, que catalisa a hidrólise de $PP_i$ em $P_i$. Qual o efeito da presença dessa enzima na síntese de acetil-CoA? Explique.

**22. Energia para o bombeamento de $H^+$.** As células parietais que recobrem o estômago contêm "bombas" na membrana que transportam íons hidrogênio do citosol (pH 7,0) para o estômago, contribuindo para acidificar o suco gástrico (pH 1,0). Calcule a energia livre necessária para transportar 1 mol de íons hidrogênio por essas bombas. (Dica: consultar Capítulo 11.) Assuma uma temperatura de 37°C.

**23. Potenciais de redução padrão.** O potencial de redução padrão, $E'^{\circ}$, de qualquer par redox é definido para a reação da semicélula:

$$\text{agente oxidante} + n \text{ elétrons} \longrightarrow \text{agente redutor}$$

Os valores de $E'^{\circ}$ para os pares conjugados redox $NAD^+$/NADH e piruvato/lactato são −0,32 V e −0,19 V, respectivamente.

(a) Qual par redox apresenta a maior tendência em perder elétrons? Explique.

(b) Qual é o agente oxidante mais forte? Explique.

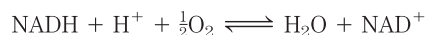
(c) Iniciando com reagentes e produtos em concentrações iguais a 1 M, em pH 7,0 e a 25°C, em qual sentido a reação seguinte ocorrerá?

$$\text{Piruvato} + \text{NADH} + H^+ \rightleftharpoons \text{lactato} + NAD^+$$

(d) Qual é a variação de energia livre padrão ($\Delta G'^{\circ}$) para a conversão de piruvato em lactato?

(e) Qual a constante de equilíbrio ($K'_{eq}$) para essa reação?

**24. Extensão da energia da cadeia respiratória.** A transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial pode ser representada pela equação da reação global

$$\text{NADH} + H^+ + \tfrac{1}{2}O_2 \rightleftharpoons H_2O + NAD^+$$

(a) Calcule $\Delta E'^{\circ}$ para a reação global da transferência de elétrons mitocondrial. Use os valores de $E'^{\circ}$ da Tabela 13-7.

(b) Calcule $\Delta G'^{\circ}$ para essa reação.

(c) Quantas moléculas de ATP podem *teoricamente* ser geradas por essa reação se a energia livre para a síntese de ATP nas condições celulares é de 52 kJ/mol?

**25. Dependência da força eletromotriz sobre as concentrações.** Calcule a força eletromotriz (em volts) registrada por um eletrodo imerso em uma solução contendo as seguintes misturas de $NAD^+$ e NADH em pH 7,0 e 25°C, com relação à semicélula de $E'^{\circ}$ 0,0 V.

(a) 1,0 mM $NAD^+$ e 10 mM NADH

(b) 1,0 mM $NAD^+$ e 1,0 mM NADH
(c) 10 mM $NAD^+$ e 1,0 mM NADH

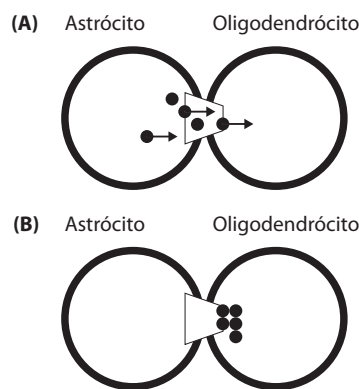
**26. A afinidade por elétrons dos compostos.** Relacione as seguintes substâncias em ordem crescente de tendência em receber elétrons: (a) $\alpha$-cetoglutarato + $CO_2$ (gerando isocitrato); (b) oxaloacetato; (c) $O_2$; (d) $NADP^+$.

**27. Sentido das reações de oxidação-redução.** Qual das reações a seguir você esperaria que ocorresse no sentido representado, em condições-padrão, na presença das enzimas apropriadas?

(a) Malato + $NAD^+$ $\longrightarrow$ oxaloacetato + NADH + $H^+$
(b) Acetoacetato + NADH + $H^+$ $\longrightarrow$ $\beta$-hidroxibutirato + $NAD^+$
(c) Piruvato + NADH + $H^+$ $\longrightarrow$ lactato + $NAD^+$
(d) Piruvato + $\beta$-hidroxibutirato $\longrightarrow$ actato + acetoacetato
(e) Malato + piruvato $\longrightarrow$ oxaloacetato + lactato
(f) Acetaldeído + succinato $\longrightarrow$ etanol + fumarato

## Problema de análise de dados

**28. A termodinâmica pode ser complicada.** A termodinâmica é uma área de estudo desafiadora e com muitas oportunidades para confusão. Um exemplo interessante é encontrado em um artigo dos pesquisadores Robinson, Hampson, Munro e Vaney, publicado no periódico *Science* em 1993. Robinson e colaboradores estudaram o movimento de pequenas moléculas entre células vizinhas do sistema nervoso, por meio de canais entre as células (junções tipo fenda). Eles demonstraram que o corante amarelo Lucifer (pequena molécula carregada negativamente) e a biocitina (pequena molécula zwitteriônica) movem-se em apenas um sentido entre dois tipos particulares de células da glia (célula não neuronal do sistema nervoso). O corante injetado em astrócitos passaria rapidamente para astrócitos, oligodendrócitos ou células de Müller adjacentes, mas o corante injetado em oligodendrócitos ou em células de Müller passaria lentamente, se passasse, para os astrócitos. Todos esses tipos celulares estão conectados por junções tipo fenda.

Embora este não tenha sido o ponto central do artigo, os autores apresentaram um modelo molecular de como esse transporte em sentido único deve ocorrer, como demonstrado em sua Figura 3:

Lê-se na legenda da figura: "Modelo de difusão do corante em sentido único entre oligodendrócitos e astrócitos acoplados, com base nas diferenças de diâmetro dos poros de conexão. Como um peixe em uma armadilha, as moléculas de corante (círculos pretos) passam de um astrócito para um oligodendrócito (A), mas não são capazes de voltar no sentido oposto (B)".

Embora esse artigo tenha passado pela revisão de uma revista científica muito respeitada, foram enviadas várias cartas ao editor (1994), mostrando que o modelo de Robinson e colaboradores violara a segunda lei da termodinâmica.

(a) Explique como o modelo viola a segunda lei. Dica: considere o que aconteceria com a entropia do sistema com concentrações iniciais iguais de corante nos astrócitos e oligodendrócitos, conectados pelas junções tipo fenda semelhantes à "armadilha de peixe".

(b) Explique por que esse modelo não funciona para moléculas pequenas, embora permita apanhar peixes.

(c) Explique por que uma armadilha de peixe *funciona* para peixes.

(d) Forneça dois mecanismos plausíveis para o transporte em sentido único das moléculas de corante entre as células que não violem a segunda lei da termodinâmica.

### Referências

Letters to the editor. (1994) *Science* **265**, 1017–1019.

**Robinson, S.R., Hampson, E.C.G.M., Munro, M.N., & Vaney, D.I.** (1993) Unidirectional coupling of gap junctions between neuroglia. *Science* **262**, 1072–1074.

14

# Glicólise, Gliconeogênese e a Via das Pentoses-Fosfato



A glicose ocupa posição central no metabolismo de plantas, animais e muitos microrganismos. Ela é relativamente rica em energia potencial e, por isso, é um bom combustível; a oxidação completa da glicose a dióxido de carbono e água ocorre com uma variação da energia livre padrão de −2.840 kJ/mol. Por meio do armazenamento da glicose na forma de polímero de alta massa molecular, como o amido e o glicogênio, a célula pode estocar grandes quantidades de unidades de hexose, enquanto mantém a osmolaridade citosólica relativamente baixa. Quando a demanda de energia aumenta, a glicose pode ser liberada desses polímeros de armazenamento intracelulares e utilizada para produzir ATP de maneira aeróbia ou anaeróbia.

A glicose, além de excelente combustível, também é um precursor admiravelmente versátil, capaz de suprir uma enorme variedade de intermediários metabólicos em reações biossintéticas. Uma bactéria como a *Escherichia coli* pode obter a partir da glicose os esqueletos carbônicos para cada aminoácido, nucleotídeo, coenzima, ácido graxo ou outro intermediário metabólico necessário para o seu crescimento. Um estudo abrangente dos destinos metabólicos da glicose compreenderia centenas ou milhares de transformações químicas. Em animais e em vegetais vasculares, a glicose tem quatro destinos principais: ela pode ser usada na síntese de polissacarídeos complexos direcionados ao espaço extracelular; ser armazenada nas células (como polissacarídeo ou como sacarose); ser oxidada a compostos de três átomos de carbonos (piruvato) por meio da glicólise, para fornecer ATP e intermediários metabólicos; ou ser oxidada pela via das pentoses-fosfato (fosfogliconato) produzindo ribose-5-fosfato para a síntese de ácidos nucleicos e NADPH para processos biossintéticos redutores (**Figura 14-1**).

Os organismos sem acesso à glicose de outras fontes devem sintetizá-la. Os organismos fotossintéticos sintetizam glicose inicialmente por redução do $CO_2$ atmosférico a trioses e, em seguida, por conversão das trioses em glicose. As células não fotossintéticas produzem glicose a partir de precursores simples com três ou quatro átomos de carbono pelo processo de gliconeogênese, que reverte a glicólise em uma via que utiliza muitas enzimas glicolíticas.

Este capítulo descreve as reações individuais da glicólise, da gliconeogênese e da via das pentoses-fosfato e o significado funcional de cada via. Descreve também os vários destinos metabólicos do piruvato produzido na glicólise. Entre eles, estão incluídas as fermentações, utilizadas por muitos organismos em nichos anaeróbios para produzir ATP e industrialmente exploradas como fontes de etanol, ácido láctico e outros produtos úteis comercialmente. Além disso, o capítulo aborda as vias que disponibilizam vários açúcares, mono, di e polissacarídeos, para a via glicolítica. A

**FIGURA 14-1 As principais vias de utilização da glicose.** Embora não sejam os únicos destinos possíveis da glicose, essas quatro vias são as mais significativas em termos de quantidade de glicose que flui através delas na maioria das células.

discussão sobre o metabolismo da glicose continua no Capítulo 15, onde os processos de síntese e degradação de carboidratos são utilizados para ilustrar os diversos mecanismos pelos quais os organismos regulam as vias metabólicas. As vias biossintéticas que utilizam a glicose para produção dos polissacarídeos da matriz extracelular, da parede celular e dos polissacarídeos de armazenamento são discutidas no Capítulo 20.

## 14.1 Glicólise

Na **glicólise** (do grego *glykys*, "doce" ou "açúcar", e *lysis*, "quebra"), uma molécula de glicose é degradada em uma série de reações catalisadas por enzimas, gerando duas moléculas do composto de três átomos de carbono, o piruvato. Durante as reações sequenciais da glicólise, parte da energia livre da glicose é conservada na forma de ATP e NADH. A glicólise foi a primeira via metabólica a ser elucidada e provavelmente seja a mais bem entendida. Desde a descoberta da fermentação, em 1897 por Eduard Buchner, em extratos de células de levedura, até a elucidação da via completa em leveduras (por Otto Warburg e Hans von Euler-Chelpin) e em músculo (por Gustav Embden e Otto Meyerhof) na década de 1930, as reações da glicólise em extratos de leveduras e de músculo foram o objetivo principal da pesquisa bioquímica. A mudança filosófica que acompanhou essas descobertas foi anunciada por Jacques Loeb em 1906:

> Por meio da descoberta de Buchner, a biologia foi libertada de outro fragmento de misticismo. A cisão do açúcar em $CO_2$ e álcool não é mais o efeito de um "princípio vital", mas sim a quebra do açúcar da cana pela invertase. A história desse problema é instrutiva, pois serve de alerta quanto a considerar problemas como além do nosso alcance porque ainda não tiveram uma solução.

O desenvolvimento de métodos de purificação de enzimas, a descoberta e o reconhecimento da importância de coenzimas, como o NAD, e a descoberta do crucial papel metabólico do ATP e de outros compostos fosforilados resultaram dos estudos da glicólise. Enzimas glicolíticas de muitas espécies foram purificadas e minuciosamente estudadas.

Hans von Euler-Chelpin, 1873–1964

Gustav Embden, 1874–1933

Otto Meyerhof, 1884–1951

A glicólise é uma via central quase universal do catabolismo da glicose, a via com o maior fluxo de carbono na maioria das células. A quebra glicolítica da glicose é a única fonte de energia metabólica em alguns tecidos e células de mamíferos (p. ex., eritrócitos, medula renal, cérebro e esperma). Alguns tecidos vegetais modificados para o armazenamento de amido (como os tubérculos da batata) e algumas plantas aquáticas (p. ex., agrião) derivam a maior parte de sua energia da glicólise; muitos microrganismos anaeróbios são totalmente dependentes da glicólise.

**Fermentação** é um termo geral para a degradação *anaeróbia* da glicose ou de outros nutrientes orgânicos para obtenção de energia, conservada como ATP. Como os organismos vivos surgiram inicialmente em uma atmosfera sem oxigênio, a quebra anaeróbia da glicose provavelmente seja o mais antigo mecanismo biológico de obtenção de energia a partir de moléculas orgânicas combustíveis. O sequenciamento do genoma de vários organismos revelou que algumas arquibactérias e alguns microrganismos parasitas são deficientes em uma ou mais enzimas da glicólise, mas possuem as enzimas essenciais da via; provavelmente realizem formas variantes de glicólise. No curso da evolução, a sequência dessas reações químicas foi completamente conservada; as enzimas glicolíticas dos vertebrados são estreitamente similares, na sequência de aminoácidos e na estrutura tridimensional, às suas homólogas em levedura e no espinafre. A glicólise difere entre as espécies apenas nos detalhes de sua regulação e no destino metabólico subsequente do piruvato formado. Os princípios termodinâmicos e os tipos de mecanismos regulatórios que governam a glicólise são comuns a todas as vias do metabolismo celular. A via glicolítica, de importância central por si só, também pode servir de modelo para muitos aspectos das vias discutidas ao longo deste livro.

Antes de estudar cada etapa da via em seus detalhes, convém examinar a glicólise como um todo.

### Uma visão geral: a glicólise tem duas fases

A quebra da glicose, formada por seis átomos de carbono, em duas moléculas de piruvato, cada uma com três carbonos, ocorre em 10 etapas, sendo que as primeiras 5 constituem a *fase preparatória* (**Figura 14-2a**). Nessas reações, a glicose é inicialmente fosforilada no grupo hidroxil ligado ao C-6 (etapa ❶). A D-glicose-6-fosfato assim formada é convertida a D-frutose-6-fosfato (etapa ❷), a qual é novamente fosforilada, desta vez em C-1, para formar D-frutose-1,6-bifosfato (etapa ❸). Nas duas reações de fosforilação, o ATP é o doador de grupos fosforil. Como todos os açúcares formados na glicólise são isômeros D, omite-se a designação D, exceto quando o objetivo é enfatizar sua estereoquímica.

A frutose-1,6-bifosfato é dividida em duas moléculas de três carbonos, a di-hidroxiacetona-fosfato e o gliceraldeído-3-fosfato (etapa ❹); essa é a etapa de "lise" que dá nome à via. A di-hidroxiacetona-fosfato é isomerizada a uma segun-

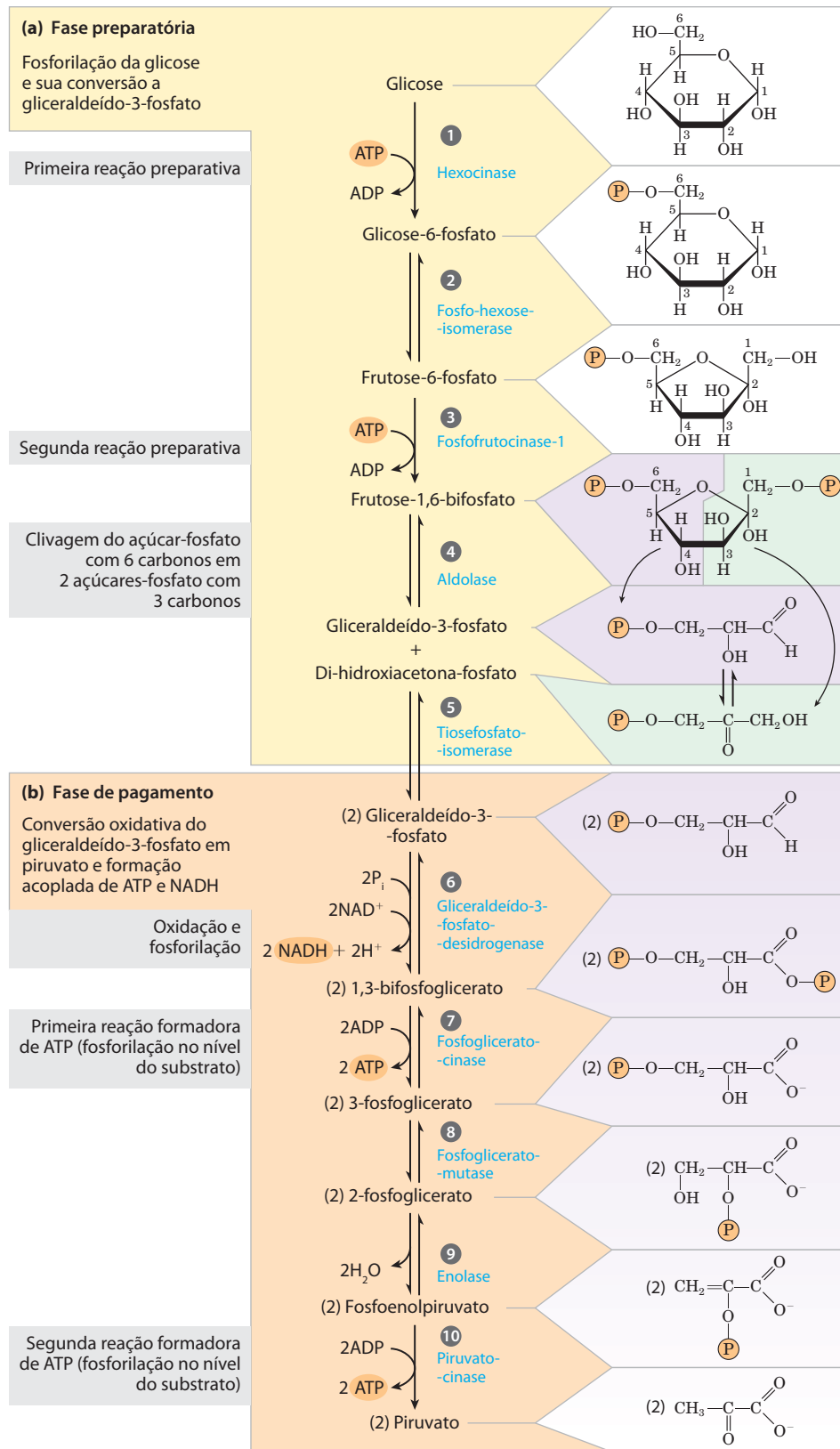



**FIGURA 14-2 As duas fases da glicólise.** Para cada molécula de glicose que passa pela fase preparatória **(a)**, duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato são formadas; as duas passam pela fase de pagamento **(b)**. O piruvato é o produto final da segunda fase da glicólise. Para cada molécula de glicose, dois ATP são consumidos na fase preparatória e quatro ATP são produzidos na fase de pagamento, dando um rendimento líquido de dois ATP por molécula de glicose convertida em piruvato. As reações numeradas correspondem aos títulos numerados discutidos no texto. Lembre-se que cada grupo fosforil, representado aqui como Ⓟ, possui duas cargas negativas ($—PO_3^{2-}$).

da molécula de gliceraldeído-3-fosfato (etapa ❺), finalizando a primeira fase da glicólise. Note que duas moléculas de ATP são consumidas antes da clivagem da glicose em duas partes de três carbonos; haverá depois um bom retorno para esse investimento. Resumindo: na fase preparatória da glicólise, a energia do ATP é consumida, aumentando o conteúdo de energia livre dos intermediários, e as cadeias de carbono de todas as hexoses metabolizadas são convertidas a um produto comum, o gliceraldeído-3-fosfato.

O ganho de energia provém da *fase de pagamento* da glicólise (Figura 14-2b). Cada molécula de gliceradeído-3--fosfato é oxidada e fosforilada por fosfato inorgânico (não por ATP) para formar 1,3-bifosfoglicerato (etapa ❻). Ocorre liberação de energia quando as duas moléculas de 1,3-bifosfoglicerato são convertidas a duas moléculas de piruvato (etapas ❼ a ❿). Grande parte dessa energia é conservada pela fosforilação acoplada de quatro moléculas de ADP a ATP. O rendimento líquido são duas moléculas de ATP por molécula de glicose utilizada, já que duas moléculas de ATP foram consumidas na fase preparatória. A energia também é conservada na fase de pagamento com a formação de duas moléculas do transportador de elétrons NADH por molécula de glicose.

Nas reações seguintes da glicólise, três tipos de transformações químicas são particularmente notáveis: (1) a degradação do esqueleto carbônico da glicose para produzir piruvato; (2) a fosforilação de ADP a ATP pelos compostos com alto potencial de transferência de grupos fosforil, formados durante a glicólise; e (3) a transferência de um íon hidreto para o $NAD^+$, formando NADH. A lógica química global da via está descrita na **Figura 14-3**.

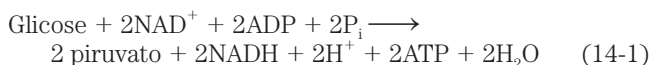
**Destinos do piruvato.** Com exceção de algumas variações interessantes entre as bactérias, o piruvato formado na glicólise é mais adiante metabolizado por três rotas catabólicas. Em organismos aeróbios ou em tecidos em condições aeróbias, a glicólise é apenas o primeiro estágio da degradação completa da glicose (**Figura 14-4**). O piruvato é oxidado, com a perda de seu grupo carboxil na forma de $CO_2$, para gerar o grupo acetil da acetil-coenzima A; o grupo acetil é então completamente oxidado a $CO_2$ no ciclo do ácido cítrico (Capítulo 16). Os elétrons originados dessas oxidações são transferidos ao $O_2$ por uma cadeia de transportadores na mitocôndria, formando $H_2O$. A energia liberada nas reações de transferência de elétrons impulsiona a síntese de ATP na mitocôndria (Capítulo 19).

O segundo destino do piruvato é a sua redução a lactato por meio da **fermentação láctica**. Quando em contração vigorosa, o músculo esquelético trabalha em condições de baixa pressão de oxigênio (**hipoxia**), em que NADH não pode ser reoxidado a $NAD^+$, mas $NAD^+$ é necessário como aceptor de elétron para a oxidação do piruvato. Sob essas condições, o piruvato é reduzido a lactato, recebendo os elétrons do NADH, dessa forma regenerando o $NAD^+$ necessário para continuar a glicólise. Certos tecidos e tipos celulares (p. ex., retina e eritrócitos) convertem glicose a lactato mesmo em condições aeróbias, e o lactato também é o produto da glicólise em condições anaeróbias em alguns microrganismos (Figura 14-4).

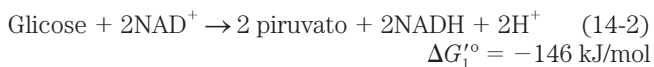
A terceira rota principal do catabolismo do piruvato leva à produção de etanol. Em alguns tecidos vegetais e em certos invertebrados, protistas e microrganismos como levedura da fabricação da cerveja e do pão, o piruvato é convertido, em hipoxia ou condições anaeróbias, em etanol e $CO_2$, um processo chamado de **fermentação etanólica** (**alcoólica**) (Figura 14-4).

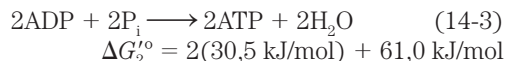
A oxidação do piruvato é um processo catabólico importante, mas o piruvato também tem destinos anabólicos. Ele pode, por exemplo, prover o esqueleto carbônico para a síntese do aminoácido alanina ou para a síntese de ácidos graxos. Essas reações anabólicas do piruvato serão retomadas em capítulos posteriores.

**A formação de ATP e NADH acoplada à glicólise.** Durante a glicólise, parte da energia da molécula de glicose é conservada na forma de ATP, enquanto a maior parte permanece no produto, o piruvato. A equação geral da glicólise é

$$\text{Glicose} + 2NAD^+ + 2ADP + 2P_i \longrightarrow 2\text{ piruvato} + 2NADH + 2H^+ + 2ATP + 2H_2O \qquad (14\text{-}1)$$

Para cada molécula de glicose degradada a piruvato, duas moléculas de ATP são geradas a partir de ADP e $P_i$, e duas moléculas de NADH são produzidas pela redução de $NAD^+$. O aceptor de hidrogênio nessa reação é $NAD^+$ (ver Figura 13-24), ligado a uma estrutura de Rossmann como mostrado na Figura 13-25. A redução de $NAD^+$ ocorre pela transferência enzimática de um íon hidreto ($:H^-$) do grupo aldeído do gliceraldeído-3-fosfato para o anel de nicotinamida de $NAD^+$, gerando a coenzima NADH reduzida. O outro átomo de hidrogênio da molécula de substrato é liberado para a solução como $H^+$.

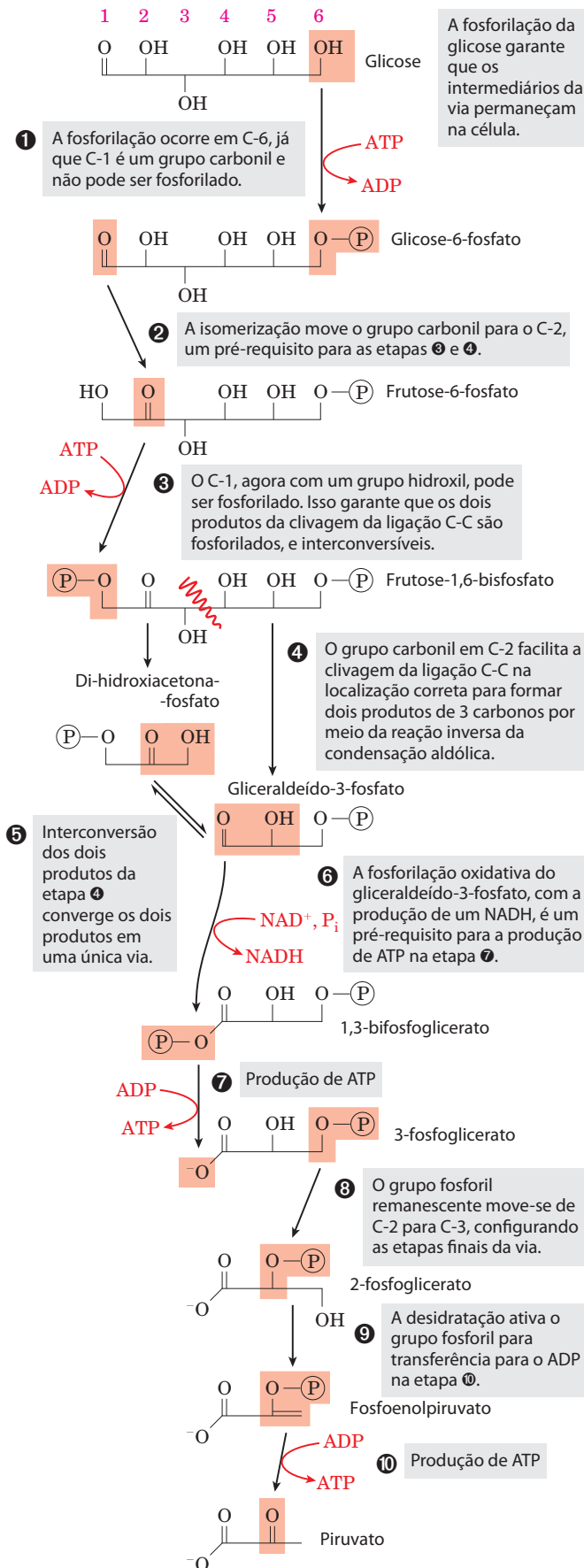
Agora, pode-se dividir a equação da glicólise em dois processos – a conversão de glicose a piruvato (exergônica):

$$\text{Glicose} + 2NAD^+ \rightarrow 2\text{ piruvato} + 2NADH + 2H^+ \qquad (14\text{-}2)$$
$$\Delta G_1'^{\circ} = -146\text{ kJ/mol}$$

e a formação de ATP a partir de ADP e $P_i$ (endergônica):

$$2ADP + 2P_i \longrightarrow 2ATP + 2H_2O \qquad (14\text{-}3)$$
$$\Delta G_2'^{\circ} = 2(30{,}5\text{ kJ/mol}) + 61{,}0\text{ kJ/mol}$$

A soma das Equações 14-2 e 14-3 fornece a variação da energia livre padrão total da glicólise, $\Delta G_s'^{\circ}$:

$$\Delta G_s'^{\circ} = \Delta G_1'^{\circ} + \Delta G_2'^{\circ} = -146\text{ kJ/mol} + 61\text{ kJ/mol} = -85\text{ kJ/mol}$$

Sob condições-padrão e sob as condições intracelulares (não padrão), a glicólise é um processo essencialmente irreversível, conduzido até a conclusão por um grande decréscimo líquido de energia livre.

**A energia remanescente do piruvato.** A glicólise libera apenas uma pequena fração da energia total disponível na molécula de glicose; as duas moléculas de piruvato formadas pela glicólise ainda contêm a maior parte da energia potencial química existente na glicose, energia que pode ser extraída por reações oxidativas no ciclo do ácido cítrico (Capítulo 16) e na fosforilação oxidativa (Capítulo 19).

**A importância dos intermediários fosforilados.** Cada um dos nove intermediários glicolíticos entre a glicose e o piruvato são fosforilados (Figura 14-2). Os grupos fosforil parecem ter três funções.

1. Como a membrana plasmática geralmente não tem transportadores para açúcares fosforilados, os intermediários glicolíticos fosforilados não podem sair da célula. Depois da fosforilação inicial, não é necessária energia adicional para reter os intermediários fosforilados na célula, apesar da grande diferença entre as suas concentrações intra e extracelular.
2. Os grupos fosforil são componentes essenciais na conservação enzimática da energia metabólica. A energia liberada na quebra das ligações de fosfoanidrido (como aquelas do ATP) é parcialmente conservada na formação de ésteres de fosfato, como glicose-6-fosfato. Compostos de fosfato de alta energia formados na glicólise (1,3-bifosfoglicerato e fosfoenolpiruvato) doam grupos fosforil ao ADP para formar ATP.
3. A energia de ligação resultante do acoplamento de grupos fosfato ao sítio ativo de enzimas reduz a energia de ativação e aumenta a especificidade das reações enzimáticas (Capítulo 6). Os grupamentos fosfato do ADP, do ATP e dos intermediários glicolíticos formam complexos com $Mg^{2+}$, e os sítios de ligação ao substrato de muitas enzimas glicolíticas são específicos para esses complexos. A maior parte das enzimas da glicólise requer $Mg^{2+}$ para sua atividade.

**FIGURA 14-3 A lógica química da via glicolítica.** Nessa versão simplificada da via, cada molécula está representada na forma linear, com os átomos de carbono e hidrogênio não descritos, para salientar as transformações químicas. Lembre-se de que glicose e frutose estão presentes principalmente em suas formas cíclicas quando em solução, apesar de estarem transitoriamente na forma linear nos sítios ativos de algumas enzimas dessa via.

A fase preparatória, etapas ❶ a ❺, converte a glicose, com 6 átomos de carbonos, em duas unidades de 3 átomos de carbonos, cada uma delas fosforilada. A oxidação das unidades de 3 átomos de carbonos é iniciada na fase de pagamento. Para produzir piruvato, as etapas químicas devem ocorrer na ordem mostrada.

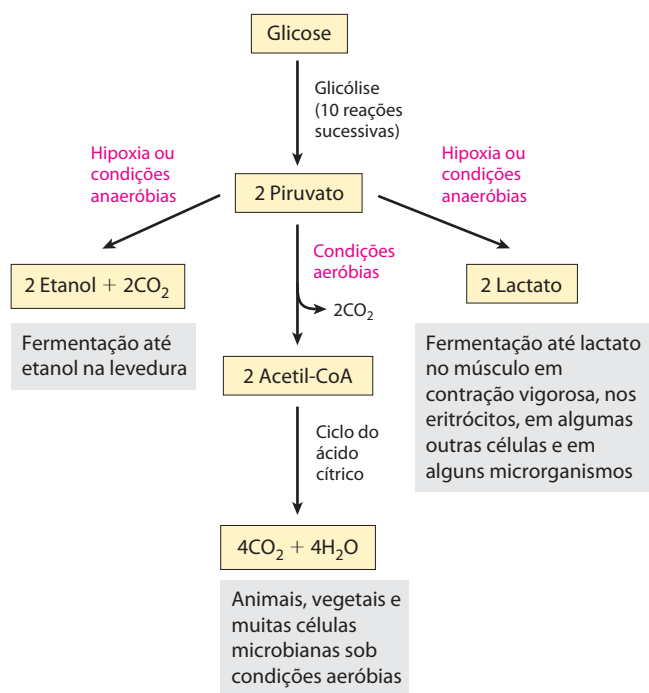



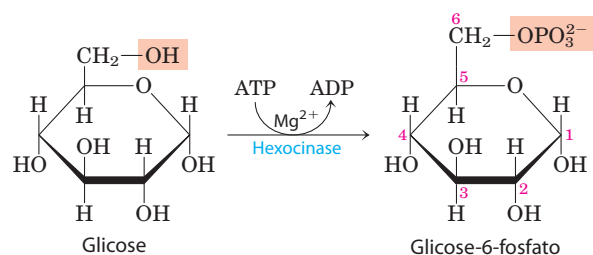
**FIGURA 14-4 Os três destinos catabólicos possíveis do piruvato formado na glicólise.** O piruvato também serve como precursor em muitas reações anabólicas, não mostradas aqui.

## A fase preparatória da glicólise requer ATP

Na fase preparatória da glicólise, duas moléculas de ATP são consumidas, e a cadeia carbônica da hexose é clivada em duas trioses-fosfato. A compreensão de que as hexoses *fosforiladas* são intermediárias na glicólise foi conseguida lentamente e por um feliz acaso. Em 1906, Arthur Harden e William Young testaram suas hipóteses de que inibidores de enzimas proteolíticas estabilizariam as enzimas da fermentação da glicose em extratos de leveduras. Adicionaram soro sanguíneo (conhecido por conter inibidores de enzimas proteolíticas) a extratos de levedura e observaram o estímulo predito do metabolismo da glicose. No entanto, em um experimento de controle realizado com a intenção de demonstrar que ferver o soro destrói a atividade estimulante, eles descobriram que o soro fervido foi tão efetivo em estimular a glicólise quanto o soro não fervido. Exames cuidadosos e testes do conteúdo do soro fervido revelaram que o fosfato inorgânico foi o responsável pela estimulação. Harden e Young logo perceberam que a glicose adicionada ao seu extrato de levedura era convertida a hexose-bifosfato (o "éster de Harden-Young", identificado como frutose-1,6-bifosfato). Esse foi o início de uma longa série de investigações sobre o papel dos ésteres orgânicos e anidridos de fosfato em bioquímica, que levaram ao nosso entendimento atual do papel central da transferência de grupos fosforil em biologia.

Arthur Harden, 1865-1940

William Young, 1878-1942

**❶ A fosforilação da glicose.** Na primeira etapa da glicólise, a glicose é ativada para as reações subsequentes, pela fosforilação em C-6 formando **glicose-6-fosfato**, com ATP como doador de grupo fosforil:

$\Delta G'^{\circ} = -16{,}7$ kJ/mol

Esta reação, irreversível em condições intracelulares, é catalisada pela **hexocinase**. Lembre-se de que cinases são enzimas que catalisam a transferência do grupo fosforil terminal do ATP a um aceptor nucleofílico (ver Figura 13-20). As cinases são uma subclasse das transferases (ver Tabela 6-3). O aceptor no caso da hexocinase é uma hexose, geralmente a D-glicose, embora a hexocinase também catalise a fosforilação de outras hexoses comuns, como D-frutose e D-manose, em alguns tecidos.

A hexocinase, como muitas outras cinases, requer $Mg^{2+}$ para sua atividade, já que o verdadeiro substrato da enzima não é $ATP^{4-}$, mas sim o complexo $MgATP^{2-}$ (ver Figura 13-12). O $Mg^{2+}$ protege as cargas negativas do grupo fosforil do ATP, tornando o átomo de fósforo terminal um alvo mais fácil para o ataque nucleofílico por um grupo —OH da glicose. A hexocinase sofre uma profunda mudança na sua conformação, um ajuste induzido, quando ela se liga à molécula de glicose; dois domínios da proteína aproximam-se um do outro cerca de 8 Å quando o ATP se liga (ver Figura 6-25). Esse movimento aproxima o ATP de uma molécula de glicose também ligada à enzima e bloqueia o acesso de água (do solvente), que, caso contrário, poderia entrar no sítio ativo e atacar (hidrolisar) as ligações fosfoanidridas do ATP. Assim como as outras nove enzimas da glicólise, a hexocinase é uma proteína solúvel e citosólica.

A hexocinase está presente em praticamente todos os organismos. O genoma humano codifica quatro hexocinases diferentes (I a IV), e todas elas catalisam a mesma reação. Duas ou mais enzimas que catalisam a mesma reação, mas são codificadas por genes diferentes, são chamadas de **isoenzimas** (ver Quadro 15-2). Uma das isoenzimas

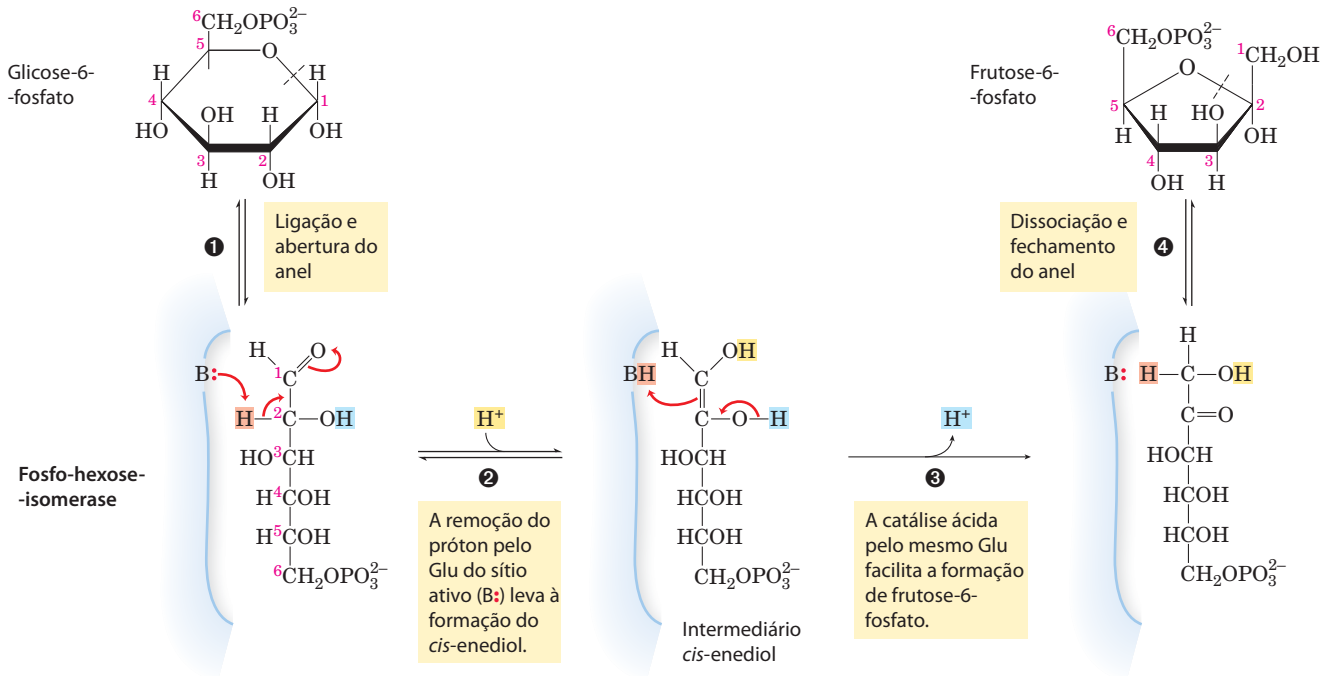
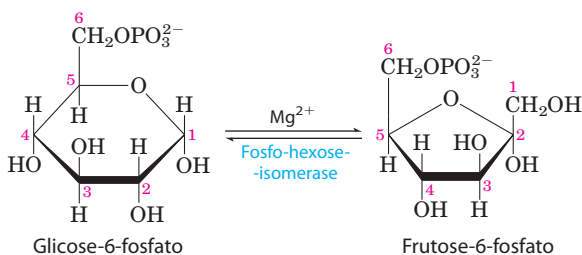



**FIGURA 14-5 A reação da fosfo-hexose-isomerase.** As reações de abertura e fechamento do anel (etapas ❶ e ❹) são catalisadas por um resíduo de His do sítio ativo, por mecanismos omitidos aqui para simplificação. O próton (em vermelho-claro) inicialmente em C-2 torna-se mais facilmente removível pela retirada do elétron pelo grupo carbonil adjacente e pelos grupos hidroxilas vizinhos. Após sua transferência do C-2 para o resíduo de Glu do sítio ativo (um ácido fraco), o próton é livremente trocado com a solução ao redor; ou seja, o próton removido de C-2 na etapa ❷ não é necessariamente o mesmo adicionado ao C-1 na etapa ❸. **Mecanismo da fosfo-hexose isomerase**

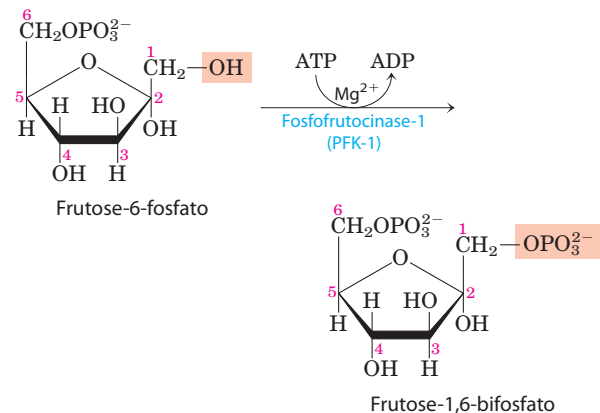
presente em hepatócitos, a hexocinase IV (também chamada de glicocinase), difere de outras formas de hexocinase com relação à cinética e às propriedades regulatórias, com consequências fisiológicas importantes, descritas na Seção 15.3.

**❷ A conversão de glicose-6-fosfato a frutose-6-fosfato.** A enzima **fosfo-hexose-isomerase** (**fosfoglicose-isomerase**) catalisa a isomerização reversível da glicose-6-fosfato (aldose) a frutose-6-fosfato (cetose):

Glicose-6-fosfato ⇌ ($Mg^{2+}$, Fosfo-hexose-isomerase) Frutose-6-fosfato

$\Delta G'^{\circ} = 1{,}7$ kJ/mol

O mecanismo dessa reação envolve um intermediário enediol (**Figura 14-5**). A reação ocorre facilmente em ambos os sentidos, como previsto pela variação relativamente pequena da energia livre padrão.

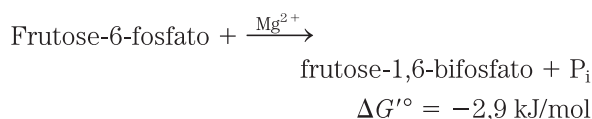
**❸ A fosforilação da frutose-6-fosfato a frutose-1,6-bifosfato.** Na segunda das duas reações preparatórias da glicólise, a enzima **fosfofrutocinase-1** (**PFK-1**) catalisa a transferência de um grupo fosforil do ATP para a frutose-6-fosfato, formando **frutose-1,6-bifosfato**:

Frutose-6-fosfato + ATP → ($Mg^{2+}$, Fosfofrutocinase-1 (PFK-1)) Frutose-1,6-bifosfato + ADP

$\Delta G'^{\circ} = -14{,}2$ kJ/mol

**CONVENÇÃO-CHAVE:** Compostos com dois grupos fosfato ou fosforil acoplados em diferentes posições da molécula são chamados de *bifosfatos* (ou compostos *bifosfo*); por exemplo, frutose-1,6-bifosfato e 1,3-bifosfoglicerato. Compostos com dois fosfatos ligados como grupo pirofosforil são chamados de *difosfatos*; por exemplo adenosina-difosfato (ADP). Regras similares são aplicadas para nomear *trifosfatos* (como inositol-1,4,5-trifosfato; ver p. 450) e *trifosfatos* (como adenosina-trifosfato, ATP). ■

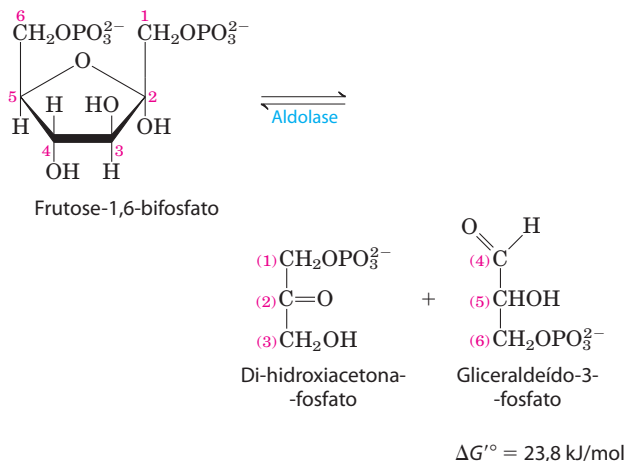
A enzima que forma a frutose-1,6-bifosfato é chamada de PFK-1, para distingui-la de uma segunda enzima (PFK-2), que catalisa a formação de frutose-2,6-bifosfato a partir de frutose-6-fosfato em uma via distinta (os papéis da PFK-2 e da frutose-2,6-bifosfato são discutidos no Capítulo 15). A reação com PFK-1 é essencialmente irreversível em condições celulares, e essa é a primeira etapa "comprometida" da via glicolítica; a glicose-6-fosfato e a frutose-6-fosfato têm outros destinos possíveis, mas a frutose-1,6-bifosfato é direcionada para a glicólise.

Certos protistas e bactérias têm, e talvez todos os vegetais tenham, uma fosfofrutocinase que utiliza pirofosfato ($PP_i$), não ATP, como o grupo fosforil doador na síntese de frutose-1,6-bifosfato:

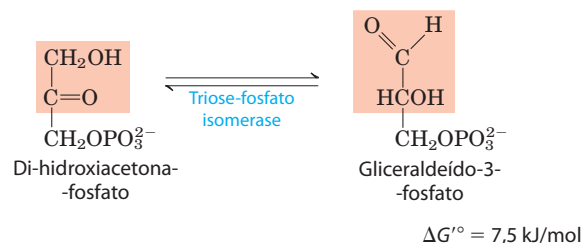
$$\text{Frutose-6-fosfato} + \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{frutose-1,6-bifosfato} + P_i$$
$$\Delta G'^{\circ} = -2{,}9 \text{ kJ/mol}$$

A fosfofrutocinase-1 está sujeita a uma complexa modulação alostérica; sua atividade estará aumentada sempre que o suprimento de ATP da célula estiver prejudicado ou quando ocorrer acúmulo dos produtos da degradação de ATP, ADP e AMP (particularmente o último). A enzima estará inibida sempre que a célula tiver muito ATP e estiver bem suprida por outro combustível, como ácidos graxos. Em alguns organismos, a frutose-2,6-bifosfato (não confundir com o produto da reação com PFK-1, a frutose-1,6-bifosfato) é um ativador alostérico potente de PFK-1. A ribulose-5-fosfato, intermediário da via das pentoses-fosfato, discutido posteriormente neste capítulo, também ativa indiretamente a fosfofrutocinase. As múltiplas esferas de regulação dessa etapa da glicólise serão discutidas em detalhe no Capítulo 15.

**❹ A clivagem da frutose-1,6-bifosfato.** A enzima **frutose-1,6-bifosfato-aldolase**, muitas vezes chamada simplesmente de **aldolase**, catalisa uma condensação aldólica reversível (ver Figura 13-4). A frutose-1,6-bifosfato é clivada para a formação de duas trioses-fosfato diferentes, a aldose **gliceraldeído-3-fosfato** e a cetose **di-hidroxiacetona-fosfato**:

Frutose-1,6-bifosfato ⇌ (Aldolase) Di-hidroxiacetona-fosfato + Gliceraldeído-3-fosfato

$\Delta G'^{\circ} = 23{,}8$ kJ/mol

Existem duas classes de aldolases. As aldolases da classe I, encontradas em animais e vegetais, utilizam o mecanismo mostrado na **Figura 14-6**. As enzimas da classe II, de fungos e bactérias, não formam a base de Schiff intermediária. Em vez disso, um íon zinco no sítio ativo está coordenado com o oxigênio do carbonil em C-2; o $Zn^{2+}$ polariza o grupo carbonil e estabiliza o intermediário enolato gerado na etapa de clivagem da ligação C—C (ver Figura 6-17).

Embora a reação da aldolase tenha uma variação da energia livre padrão fortemente positiva no sentido de clivar a frutose-1,6-bifosfato, nas baixas concentrações dos reagentes presentes na célula a variação real da energia livre é pequena, e a reação da aldolase é prontamente reversível. Será visto posteriormente que a aldolase age no sentido reverso durante o processo de gliconeogênese (ver Figura 14-17).

**❺ A interconversão das trioses-fosfato.** Apenas uma das duas trioses-fosfato formada pela aldolase, o gliceraldeído-3-fosfato, pode ser diretamente degradada nas etapas subsequentes da glicólise. O outro produto, a di-hidroxiacetona-fosfato, é rápida e reversivelmente convertida a gliceraldeído-3-fosfato pela quinta enzima da sequência glicolítica, a **triose-fosfato-isomerase**:

O mecanismo de reação é similar ao da reação promovida pela fosfo-hexose-isomerase na etapa ❷ da glicólise (Figura 14-5). Depois da reação da triose-fosfato-isomerase, os átomos de carbono derivados de C-1, C-2 e C-3 da glicose inicial são quimicamente indistinguíveis de C-6, C-5 e C-4, respectivamente (**Figura 14-7**); as duas "metades" da glicose geram gliceraldeído-3-fosfato.

Essa reação completa a fase preparatória da glicólise. A molécula de hexose foi fosforilada em C-1 e C-6 e então clivada para formar duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato.

## A fase de pagamento da glicólise produz ATP e NADH

A fase de pagamento da glicólise (Figura 14-2b) inclui as etapas de fosforilação que conservam energia, nas quais parte da energia química da molécula da glicose é conservada na forma de ATP e NADH. Lembre-se de que uma molécula de glicose rende duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato, e as duas metades da molécula de glicose seguem a mesma via na segunda fase da glicólise. A conversão das duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato a duas moléculas de piruvato é acompanhada pela formação de quatro moléculas de ATP a partir de ADP. No entanto, o rendimento

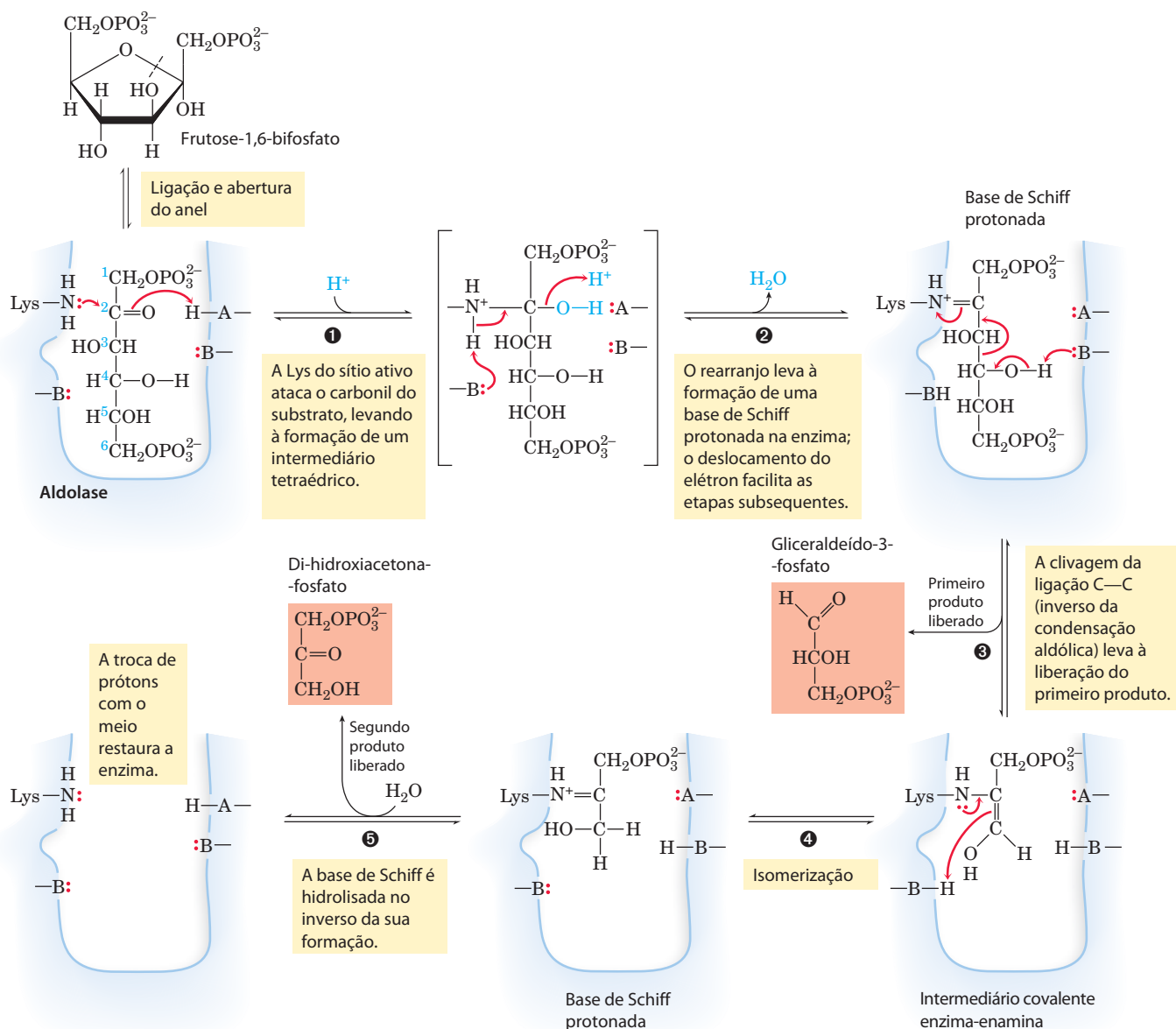



**FIGURA 14-6 A reação da aldolase de classe I.** A reação mostrada aqui é o inverso de uma condensação aldólica. Observe que a clivagem entre C-3 e C-4 depende da presença do grupo carbonil em C-2, que é convertido a uma imina no sítio ativo da enzima. A e B representam os resíduos de aminoácidos que servem como ácido (A) ou base (B).

líquido de ATP por molécula de glicose consumida é de apenas dois, já que dois ATP foram consumidos na fase preparatória da glicólise para fosforilar as duas extremidades da molécula da hexose.

**❻ A oxidação do gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato.** A primeira etapa da fase de pagamento é a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato a **1,3-bifosfoglicerato**, catalisada pela enzima **gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase**:

Gliceraldeído-3--fosfato + Fosfato inorgânico ⇌ 1,3-Bifosfoglicerato

$NAD^+$ → $NADH + H^+$

Gliceraldeído-3--fosfato-desidrogenase

$\Delta G'^\circ = 6{,}3$ kJ/mol

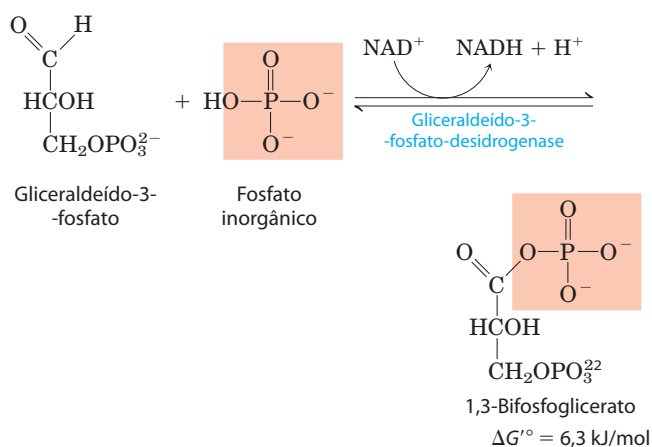
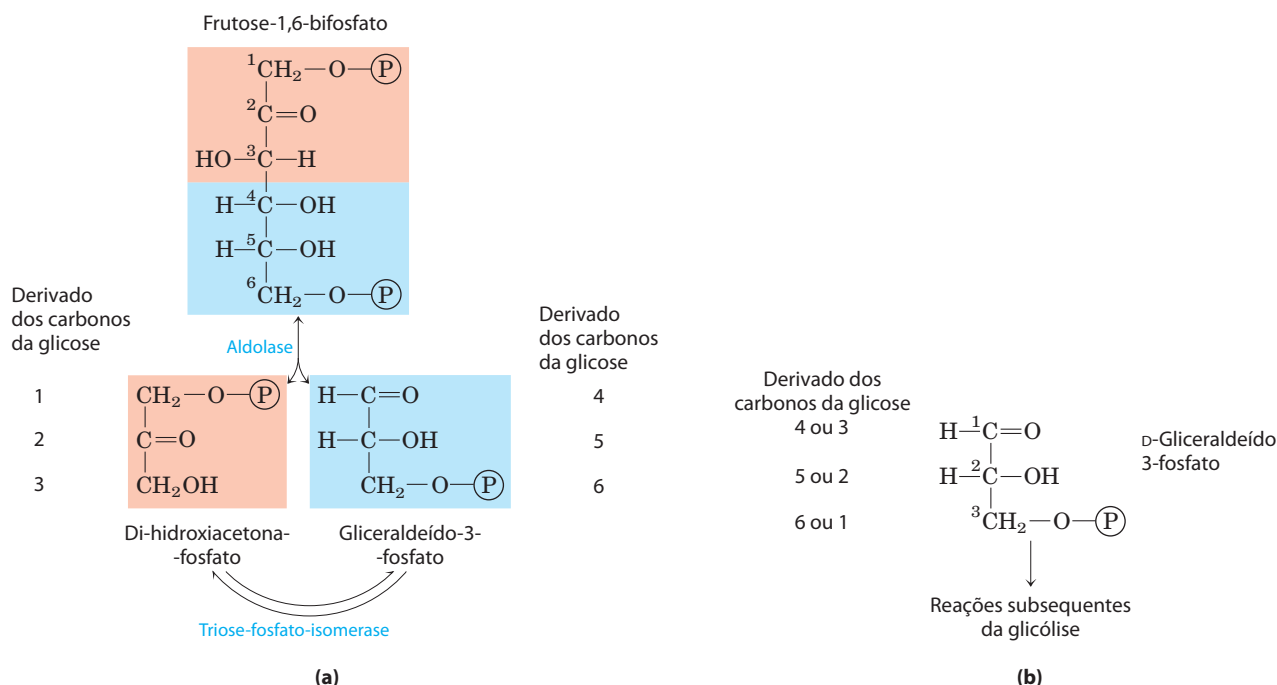



**FIGURA 14-7 Destino dos carbonos da glicose na formação de gliceraldeído-3-fosfato. (a)** A origem dos carbonos nos dois compostos de três carbonos nas reações da aldolase e da triose-fosfato-isomerase. O produto final das duas reações é gliceraldeído-3-fosfato (duas moléculas). **(b)** Cada carbono do gliceraldeído-3-fosfato é derivado de um ou outro dos dois átomos de carbono específicos da glicose. Note que a numeração dos átomos de carbono do gliceraldeído-3-fosfato difere daquela da glicose da qual ele é derivado. No gliceraldeído-3-fosfato, o grupo funcional mais complexo (o grupo carbonil) é especificado como C-1. Esta troca de numeração é importante para interpretar os experimentos com glicose em que um único carbono é marcado com radioisótopo. (Ver Problemas 6 e 9 no final deste capítulo.)

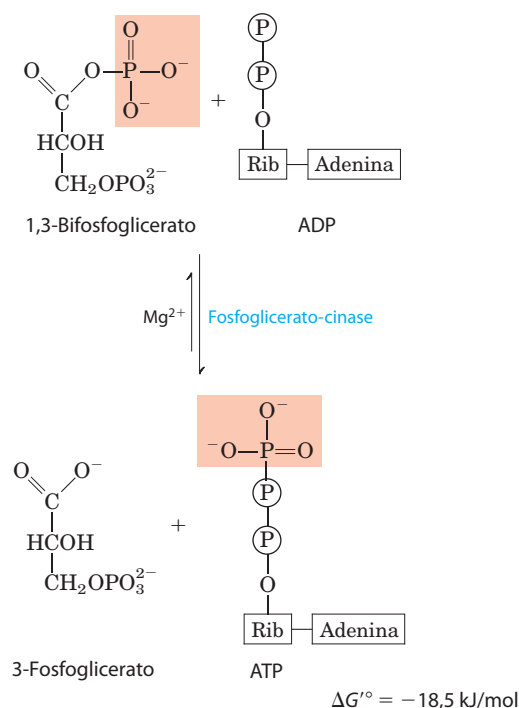
Esta é a primeira das duas reações de conservação de energia da glicólise que no final leva à formação de ATP. O grupo aldeído do gliceraldeído-3-fosfato é oxidado, não em um grupamento carboxil livre, mas em um anidrido de ácido carboxílico com ácido fosfórico. Esse tipo de anidrido, chamado de **acil-fosfato**, tem energia livre padrão de hidrólise muito alta ($\Delta G'^{\circ} = -49{,}3$ kJ/mol; ver Figura 13-14, Tabela 13-6). A maior parte da energia livre de oxidação do grupo aldeído do gliceraldeído-3-fosfato é conservada pela formação do grupamento acil-fosfato no C-1 do 1,3-bifosfoglicerato.

O gliceraldeído-3-fosfato é covalentemente ligado à desidrogenase durante a reação (**Figura 14-8**). O grupo aldeído do gliceraldeído-3-fosfato reage com o grupamento —SH de um resíduo de Cys essencial no sítio ativo, em reação análoga à formação de um hemiacetal (ver Figura 7-5), nesse caso produzindo um *tio*-hemiacetal. A reação do resíduo de Cys essencial com um metal pesado como o $Hg^{2+}$ inibe a enzima irreversivelmente.

A quantidade de $NAD^+$ em uma célula ($\leq 10^{-5}$ M) é muito menor que a quantidade de glicose metabolizada em poucos minutos. A via glicolítica pararia se o NADH formado nesta etapa da glicólise não fosse continuamente reoxidado e reciclado. A discussão sobre a reciclagem de $NAD^+$ será retomada posteriormente neste capítulo.

**❼ A transferência de grupo fosforil de 1,3-bifosfoglicerato a ADP.** A enzima **fosfoglicerato-cinase** transfere o grupo fosforil de alta energia do grupo carboxil do 1,3-bifosfoglicerato para o ADP, formando ATP e **3-fosfoglicerato**:

1,3-Bifosfoglicerato + ADP
$\xrightleftharpoons[\text{Fosfoglicerato-cinase}]{Mg^{2+}}$
3-Fosfoglicerato + ATP

$\Delta G'^{\circ} = -18{,}5$ kJ/mol

Observe que a fosfoglicerato-cinase tem esse nome devido à reação inversa, na qual ela transfere um grupo fosforil do ATP para o 3-fosfoglicerato. Como todas as enzimas, ela catalisa a reação em ambos os sentidos. Essa enzima age no sentido sugerido pelo seu nome durante a gliconeogênese (ver

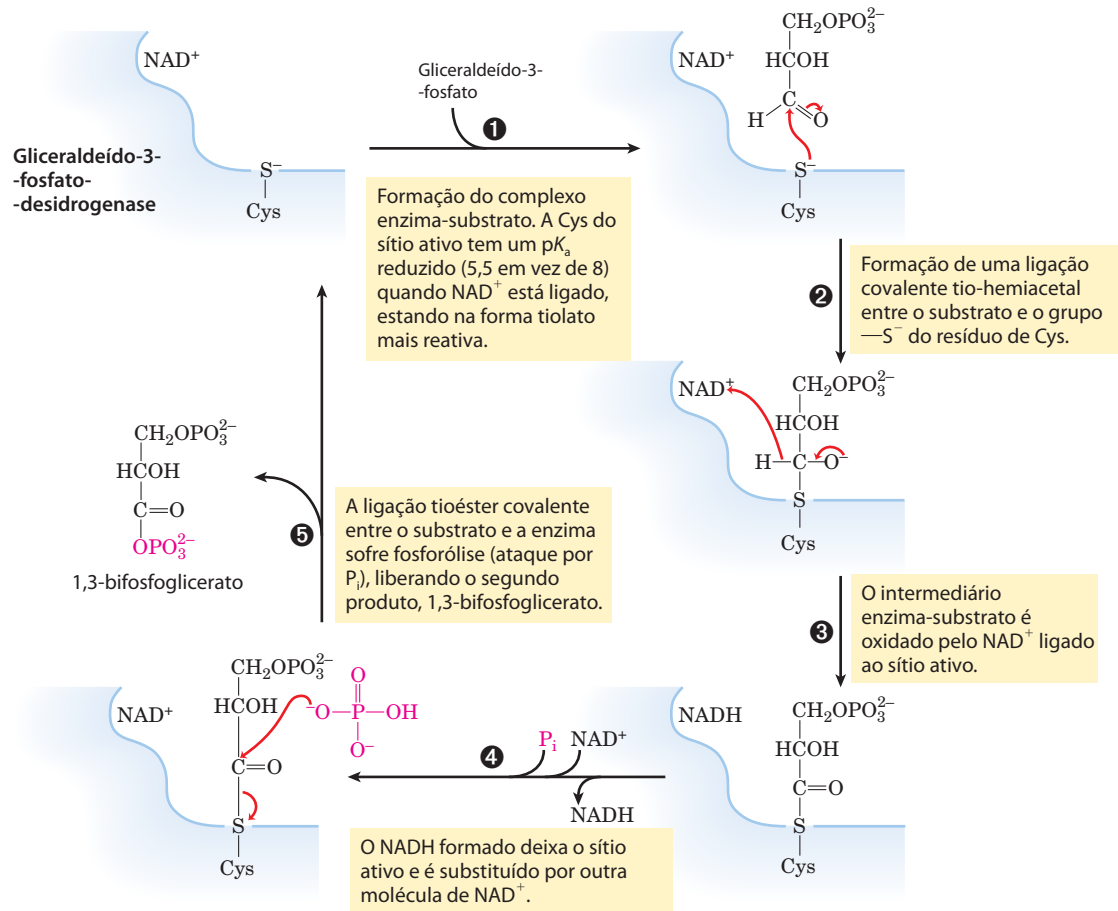
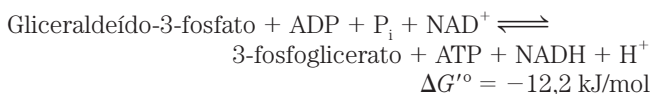



**FIGURA 14-8** **A reação da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase.**

Figura 14-17) e durante a fixação de $CO_2$ fotossintético (ver Figura 20-4). Na glicólise, a reação que ela catalisa prossegue como mostrado anteriormente, no sentido da síntese de ATP.

As etapas ❻ e ❼ da glicólise constituem um processo de acoplamento de energia em que 1,3-bifosfoglicerato é um intermediário comum; ele é formado na primeira reação (que seria endergônica se isolada) e seu grupo acil-fosfato é transferido ao ADP na segunda reação (que é extremamente exergônica). A soma dessas duas reações é

$$\text{Gliceraldeído-3-fosfato} + \text{ADP} + P_i + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{3-fosfoglicerato} + \text{ATP} + \text{NADH} + \text{H}^+$$
$$\Delta G'^\circ = -12{,}2 \text{ kJ/mol}$$

Portanto, a reação global é exergônica.

Lembre-se do Capítulo 13 de que a variação de energia livre real, $\Delta G$, é determinada pela variação de energia livre padrão, $\Delta G'^\circ$, e pela lei da ação das massas, $Q$, que é a relação [produtos]/[reagentes] (ver Equação 13-4). Para a etapa ❻:

$$\Delta G = \Delta G'^\circ + RT \ln Q$$
$$= \Delta G'^\circ + RT \ln \frac{[\text{1,3-bifosfoglicerato}][\text{NADH}]}{[\text{gliceraldeído-3-fosfato}][P_i][\text{NAD}^+]}$$

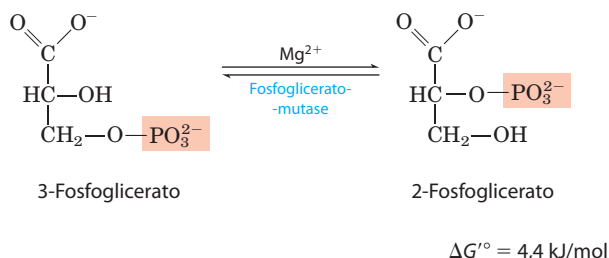
Note que a $[H^+]$ não está incluída em $Q$. Em cálculos bioquímicos, a $[H^+]$ é considerada uma constante ($10^{-7}$ M), e essa constante está incluída na definição de $\Delta G'^\circ$ (p. 507).

Quando a lei da ação das massas é menor que 1,0, seu logaritmo natural tem sinal negativo. No citosol, onde essas reações ocorrem, a razão $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ é pequena, contribuindo para um baixo valor de $Q$. A etapa ❼, por consumir o produto da etapa ❻ (1,3-bifosfoglicerato), mantém a [1,3-bifosfoglicerato] relativamente baixa no equilíbrio e assim mantém $Q$ pequeno para o processo global de acoplamento de energia. Quando $Q$ é pequeno, a contribuição de ln $Q$ pode tornar $\Delta G$ fortemente negativo. Essa é simplesmente outra forma de mostrar como as duas reações, as etapas ❻ e ❼, são acopladas por meio de um intermediário comum.

O resultado do acoplamento dessas reações, ambas reversíveis em condições celulares, é que a energia liberada da oxidação de um aldeído a um grupo carboxilato é conservada pela formação acoplada de ATP a partir de ADP e $P_i$. A formação de ATP pela transferência do grupo fosforil de um substrato, como o 1,3-bifosfoglicerato, é chamada de **fosforilação no nível do substrato**, para distinguir esse mecanismo daquele da **fosforilação ligada à respiração**. As fosforilações no nível do substrato envolvem enzimas solúveis e intermediários químicos (nesse caso, 1,3-bifosfoglicerato). As fosforilações ligadas à respiração, por outro lado, envolvem enzimas ligadas à membrana e gradientes transmembrana de prótons (Capítulo 19).

**❽ A conversão de 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato.** A enzima **fosfoglicerato-mutase** catalisa o deslocamento reversível do grupo fosforil entre C-2 e C-3 do glicerato; $Mg^{2+}$ é essencial para essa reação:

3-Fosfoglicerato $\xrightleftharpoons[\text{Fosfoglicerato-mutase}]{Mg^{2+}}$ 2-Fosfoglicerato

$\Delta G'^{\circ} = 4{,}4$ kJ/mol

A reação ocorre em duas etapas (**Figura 14-9**). O grupo fosforil inicialmente acoplado a um resíduo de His da mutase é transferido a um grupo hidroxil em C-2 do 3-fosfoglicerato, formando 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG). O grupo fosforil em C-3 do 2,3-BPG é então transferido para o mesmo resíduo de His, produzindo 2-fosfoglicerato e regenerando a enzima fosforilada. A fosfoglicerato-mutase é inicialmente fosforilada pela transferência de um fosforil de 2,3-BPG, necessário em pequenas quantidades para iniciar o ciclo catalítico e é continuamente regenerado por esse ciclo.

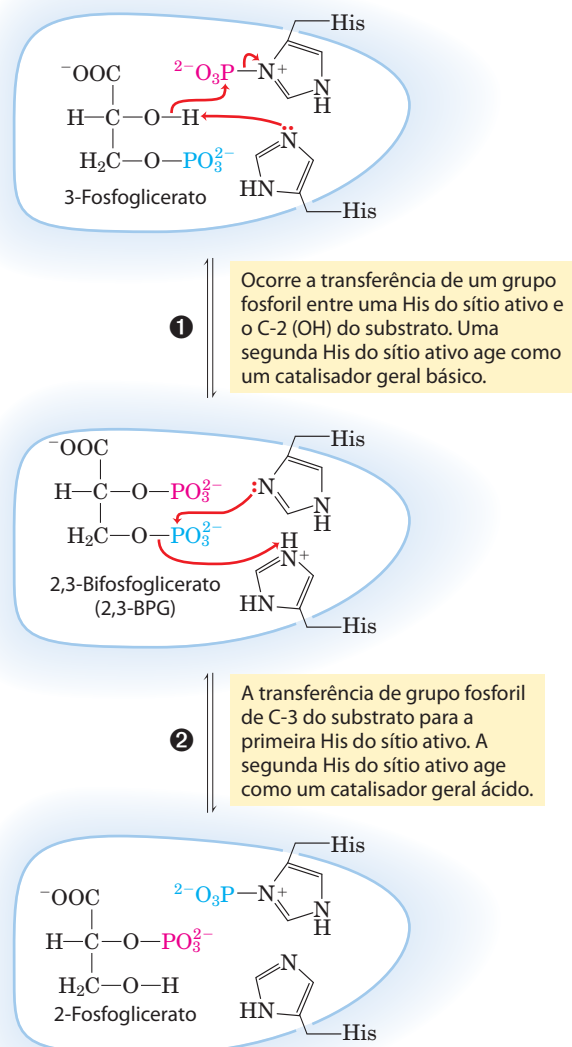



**FIGURA 14-9 A reação da fosfoglicerato-mutase.**

**❾ A desidratação de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato.** Na segunda reação glicolítica que gera um composto com alto potencial de transferência de grupamento fosforil (a primeira foi a etapa ❻), a **enolase** promove a remoção reversível de uma molécula de água do 2-fosfoglicerato para gerar **fosfoenolpiruvato** (**PEP**):

2-Fosfoglicerato $\xrightleftharpoons[\text{Enolase}]{}$ Fosfoenolpiruvato + $H_2O$

$\Delta G'^{\circ} = 7{,}5$ kJ/mol

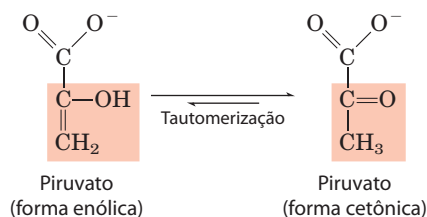
O mecanismo da reação da enolase envolve um intermediário enólico estabilizado por $Mg^{2+}$ (ver Figura 6-26). A reação converte um composto com relativamente baixo potencial de transferência de grupo fosforil (o $\Delta G'^{\circ}$ para a hidrólise de 2-fosfoglicerato é $-17{,}6$ kJ/mol) para um com alto potencial de transferência de grupo fosforil (o $\Delta G'^{\circ}$ para a hidrólise de PEP é $-61{,}9$ kJ/mol) (ver Figura 13-13, Tabela 13-6).

**❿ A transferência de um grupo fosforil do fosfoenolpiruvato para ADP.** A última etapa na glicólise é a transferência do grupo fosforil do fosfoenolpiruvato ao ADP, catalisada pela **piruvato-cinase**, que exige $K^+$ e $Mg^{2+}$ ou $Mn^{2+}$:

Fosfoenolpiruvato + ADP $\xrightarrow[\text{Piruvato-cinase}]{Mg^{2+}, K^+}$ Piruvato + ATP

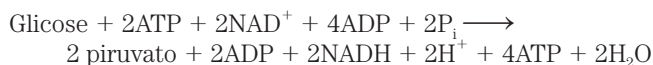
$\Delta G'^{\circ} = -31{,}4$ kJ/mol

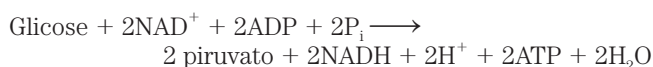
Nesta fosforilação no nível do substrato, o **piruvato** resultante aparece inicialmente em sua forma enólica, depois tautomeriza de modo rápido e não enzimático à sua forma cetônica, que predomina em pH 7,0:

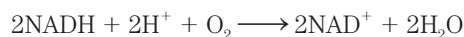
Piruvato (forma enólica) $\rightleftharpoons$ (Tautomerização) Piruvato (forma cetônica)

A reação global tem grande variação negativa da energia livre padrão, devido, em grande parte, à conversão espontânea da forma enólica do piruvato à forma cetônica (ver Figura 13-13). Aproximadamente metade da energia liberada pela hidrólise de PEP ($\Delta G'^{\circ} = -61,9$ kJ/mol) é conservada na formação da ligação fosfoanidrido do ATP ($\Delta G'^{\circ} = -30,5$ kJ/mol), e o restante ($-31,4$ kJ/mol) constitui uma grande força que empurra a reação no sentido da síntese de ATP. A regulação da piruvato-cinase será discutida no Capítulo 15.

## O balanço geral mostra um ganho líquido de ATP

Agora, pode-se construir um balanço da glicólise para demonstrar (1) o destino do esqueleto de carbono da glicose, (2) a entrada de $P_i$ e ADP e a saída de ATP, e (3) o caminho dos elétrons nas reações de oxidação-redução. O lado esquerdo da equação que se segue mostra todas as entradas de ATP, $NAD^+$, ADP e $P_i$ (ver Figura 14-2), e o lado direito mostra todas as saídas (lembre-se de que cada molécula de glicose rende duas moléculas de piruvato):

$$\text{Glicose} + 2\text{ATP} + 2\text{NAD}^+ + 4\text{ADP} + 2\text{P}_i \longrightarrow 2\text{ piruvato} + 2\text{ADP} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 4\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$$

Cancelando os termos comuns nos dois lados da equação, é obtida a equação global para a glicólise em condições aeróbias:

$$\text{Glicose} + 2\text{NAD}^+ + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i \longrightarrow 2\text{ piruvato} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$$

As duas moléculas de NADH formadas pela glicólise no citosol são, em condições aeróbias, reoxidadas a $NAD^+$ pela transferência de seus elétrons para a cadeia de transporte de elétrons, que em células eucarióticas está localizada na mitocôndria. A cadeia de transporte de elétrons conduz esses elétrons para o seu destino final, o $O_2$:

$$2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + \text{O}_2 \longrightarrow 2\text{NAD}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$$

A transferência de elétrons do NADH para o $O_2$ na mitocôndria fornece a energia para a síntese de ATP pela fosforilação ligada à respiração (Capítulo 19).

No processo glicolítico em geral, uma molécula de glicose é convertida a duas moléculas de piruvato (a via do carbono). Duas moléulas de ADP e duas de $P_i$ são convertidas a duas moléculas de ATP (a via dos grupos fosforil). Quatro elétrons, na forma de íons hidreto, são transferidos de duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato para duas de $NAD^+$ (a via dos elétrons).

## A glicólise é precisamente regulada

Durante seus estudos sobre a fermentação da glicose por leveduras, Louis Pasteur descobriu que tanto a velocidade quanto a quantidade total de glicose consumida é muitas vezes maior em condições anaeróbias do que em aeróbias. Estudos posteriores com músculo confirmaram a grande variação nas taxas da glicólise anaeróbia e aeróbia. As bases bioquímicas para esse "efeito Pasteur" agora estão claras. O rendimento de ATP da glicólise em condições anaeróbias (2 ATP por molécula de glicose) é muito menor do que aquele a partir da oxidação completa da glicose a $CO_2$ em condições aeróbias (30 ou 32 ATP por glicose; ver Tabela 19-5). Portanto, para produzir a mesma quantidade de ATP, é necessário consumir cerca de 15 vezes mais glicose em condições anaeróbias do que aeróbias.

O fluxo de glicose pela via glicolítica é regulado para manter os níveis de ATP praticamente constantes (assim como quantidades adequadas dos intermediários glicolíticos que possuem papéis biossintéticos). O ajuste necessário na velocidade da glicólise é alcançado pela interação complexa entre o consumo de ATP, a regeneração de NADH e a regulação alostérica de algumas enzimas glicolíticas – incluindo a hexocinase, a PFK-1 e a piruvato-cinase – e as flutuações segundo a segundo das concentrações dos metabólitos-chave que refletem o equilíbrio celular entre a produção e o consumo de ATP. Em uma escala de tempo um pouco maior, a glicólise é regulada pelos hormônios glucagon, adrenalina e insulina e por variações na expressão de genes de várias enzimas glicolíticas. Um caso especialmente interessante de regulação anormal da glicólise é visto no câncer. O bioquímico alemão Otto Warburg foi o primeiro, em 1928, a observar que tumores de praticamente todos os tipos possuem velocidade da glicólise muito maior que a de tecidos normais, *mesmo quando oxigênio está disponível*. Esse "efeito Warburg" é a base de vários métodos de detecção e tratamento do câncer (Quadro 14-1).

Warburg é considerado o bioquímico mais importante da primeira metade do século XX. Ele fez contribuições inspiradoras em muitas outras áreas da bioquímica, incluindo respiração, fotossíntese e enzimologia do metabolismo intermediário. Iniciando em 1930, Warburg e seus colaboradores purificaram e cristalizaram sete enzimas da glicólise. A equipe de Warburg desenvolveu uma ferramenta experimental que revolucionou os estudos bioquímicos do metabolismo oxidativo: o manômetro de Warburg, que mede diretamente o consumo de oxigênio dos tecidos por monitorar variações no volume de gás, e assim permite medidas quantitativas de qualquer enzima com atividade oxidativa.

Otto Warburg, 1883-1970

QUADRO 14-1  MEDICINA **Alta taxa da glicólise em tumores sugere alvos para quimioterapia e facilita o diagnóstico**

Em muitos tipos de tumores encontrados em humanos e em outros animais, a captação e a degradação de glicose ocorrem cerca de 10 vezes mais rápido do que em tecidos normais, não cancerosos. A maior parte das células tumorais cresce em condições de hipoxia (i.e., com suprimento de oxigênio limitado) devido à falta, pelo menos inicialmente, das redes capilares que suprem com oxigênio suficiente. Células cancerosas localizadas a mais de 100 a 200 $\mu$m dos capilares mais próximos dependem somente da glicose (sem oxidação adicional de piruvato) para a maior parte da produção de ATP. O rendimento de energia (2 ATP por glicose) é muito menor do que o que pode ser obtido pela oxidação completa do piruvato a $CO_2$ na mitocôndria (cerca de 30 ATP por glicose; Capítulo 19). Portanto, para fazer a mesma quantidade de ATP, as células tumorais devem captar muito mais glicose do que as células normais, convertendo-a a piruvato e depois a lactato enquanto reciclam NADH. É provável que as duas etapas iniciais na transformação de uma célula normal em uma célula tumoral sejam (1) a mudança para a dependência da glicólise na produção de ATP, e (2) o desenvolvimento de tolerância a pH baixo no fluido extracelular (causado pela liberação do produto final da glicólise, o ácido láctico). Em geral, quanto mais agressivo é o tumor, maior é a taxa de glicólise.

Esse aumento da glicólise é alcançado ao menos em parte pelo aumento da síntese das enzimas glicolíticas e dos transportadores da membrana plasmática GLUT1 e GLUT3 (ver Tabela 11-3) que carregam a glicose para a célula. (Lembre-se de que GLUT1 e GLUT3 não são dependentes de insulina.) O **fator de transcrição induzível por hipoxia** (**HIF-1**, de *hypoxia-inducible transcription factor*) é uma proteína que regula a síntese de mRNA, estimulando a produção de pelo menos oito enzimas glicolíticas e dos transportadores de glicose, quando a oferta de glicose está limitada (Figura Q-1). Com a alta velocidade de glicólise resultante, as células tumorais podem sobreviver em condições anaeróbias até que o suprimento de vasos sanguíneos alcance o tumor em crescimento. Outra proteína induzida por HIF-1 é o hormônio peptídico VEGF (fator de crescimento vascular endotelial, de *vascular endothelial growth factor*), que estimula o crescimento dos vasos sanguíneos (angiogênese) em direção do tumor.

Existe também a evidência de que a proteína supressora de tumor p53, mutada na maior parte dos tipos de câncer (ver Seção 12.12), controla a síntese e a montagem das proteínas mitocondriais essenciais para o transporte dos elétrons ao $O_2$. As células com p53 mutada são deficientes no transporte de elétrons na mitocôndria e são forçadas a depender mais significativamente da glicólise para a produção de ATP (Figura Q-1).

Essa dependência maior dos tumores pela glicólise em comparação aos tecidos normais sugere uma possibilidade de terapia anticâncer: inibidores da glicólise poderiam atingir e matar tumores por esgotar seu suprimento de ATP. Três inibidores da hexocinase mostram-se promissores como agentes quimioterápicos: 2-desoxiglicose,

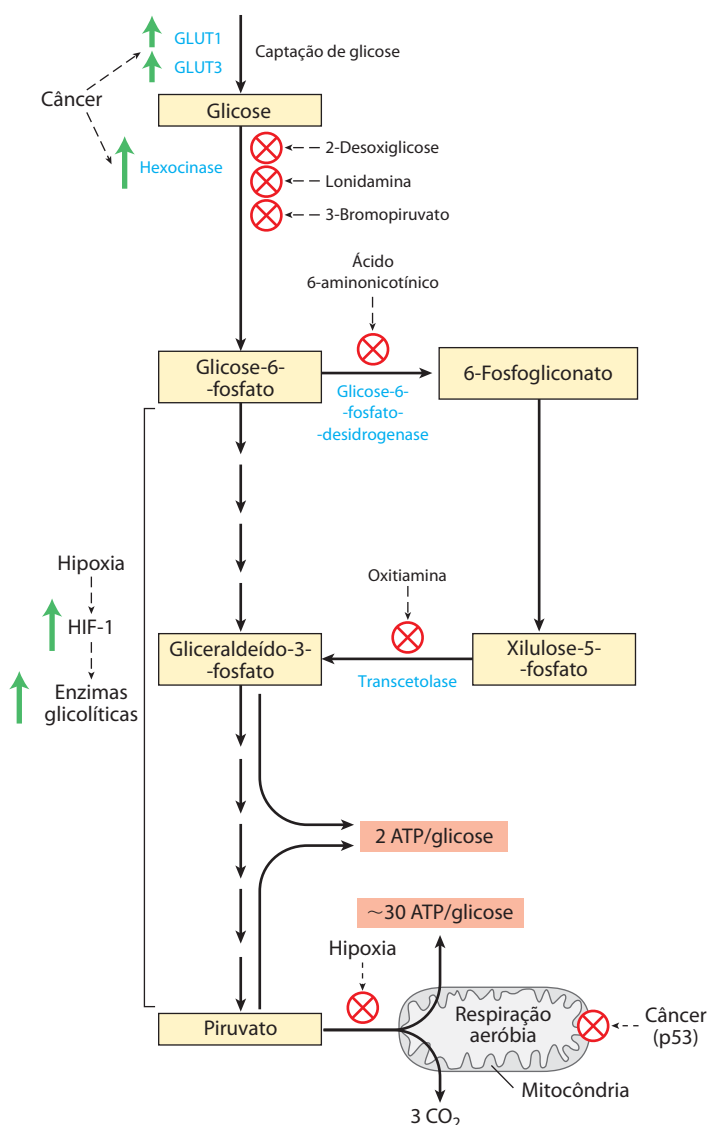



**FIGURA Q-1** O metabolismo anaeróbio da glicose em células tumorais rende muito menos ATP (2 por glicose) do que a oxidação completa a $CO_2$ que ocorre em células saudáveis em condições aeróbias (~30 ATP por glicose), de forma que uma célula tumoral deve consumir muito mais glicose para produzir a mesma quantidade de ATP. Os transportadores de glicose e a maior parte das enzimas glicolíticas estão superexpressos em tumores. Compostos que inibem as enzimas hexocinase, glicose-6-fosfato-desidrogenase ou transcetolase bloqueiam a produção de ATP pela glicólise, privando assim a célula cancerosa de energia e matando-a.

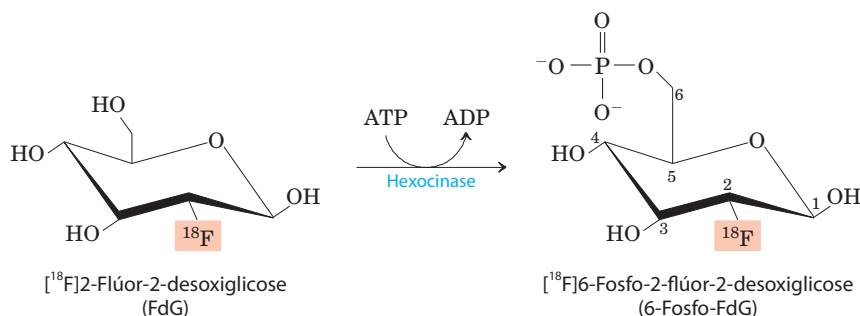



**FIGURA Q-2** A fosforilação da 2-flúor-2-desoxiglicose marcada com $^{18}$F pela hexocinase mantém o FdG na célula (como 6-fosfo-FdG), onde sua presença pode ser detectada por emissão de pósitrons do $^{18}$F.

lonidamina e 3-bromopiruvato. Por impedir a formação de glicose-6-fosfato, esses compostos não apenas privam as células tumorais de ATP glicoliticamente produzido, mas também evitam a formação de pentoses-fosfato pela via das pentoses-fosfato, que também inicia com glicose-6-fosfato. Na ausência de pentoses-fosfato, a célula não consegue sintetizar os nucleotídeos essenciais para a síntese de DNA e de RNA, e assim não consegue crescer nem se dividir. Outro fármaco anticâncer já aprovado para o uso clínico é o imatinibe (Gleevec), descrito no Quadro 12-5. Ele inibe uma tirosina-cinase específica, impedindo a síntese aumentada da hexocinase, que normalmente é ativada por essa cinase específica. O análogo de tiamina oxitiamina, que bloqueia a ação de uma enzima tipo transcetolase que converte a xilulose-5-fosfato a gliceraldeído-3-fosfato (Figura Q-1), está em triagem pré-clínica como fármaco antitumoral.

A alta taxa glicolítica em células tumorais também tem utilidade para diagnósticos. As taxas relativas em que os tecidos captam glicose podem ser usadas em alguns casos para identificar a localização de tumores. Em tomografia por emissão de pósitrons (PET, de *positron emission tomography*), injeta-se nos pacientes um análogo inofensivo da glicose isotopicamente marcado que é captado, mas não metabolizado pelos tecidos. O composto marcado é a 2-flúor-2-desoxiglicose (FdG), em que o grupo hidroxil em C-2 da glicose é substituído por $^{18}$F (Figura Q-2). Esse composto é captado pelos transportadores GLUT, sendo um bom substrato para a hexocinase, mas não pode ser convertido ao intermediário enediol na reação da fosfo-hexose-isomerase (ver Figura 14-5) e consequentemente se acumula como 6-fosfo-FdG. A extensão do seu acúmulo depende da sua taxa de captação e fosforilação, que, como citado anteriomente, costuma ser 10 ou mais vezes maior em tumores do que em tecidos normais. O decaimento do $^{18}$F libera pósitrons (dois por átomo de $^{18}$F) que podem ser detectados por uma série de detectores sensíveis localizados ao redor do corpo, o que permite a localização acurada de 6-fosfo-FdG acumulado (Figura Q-3).

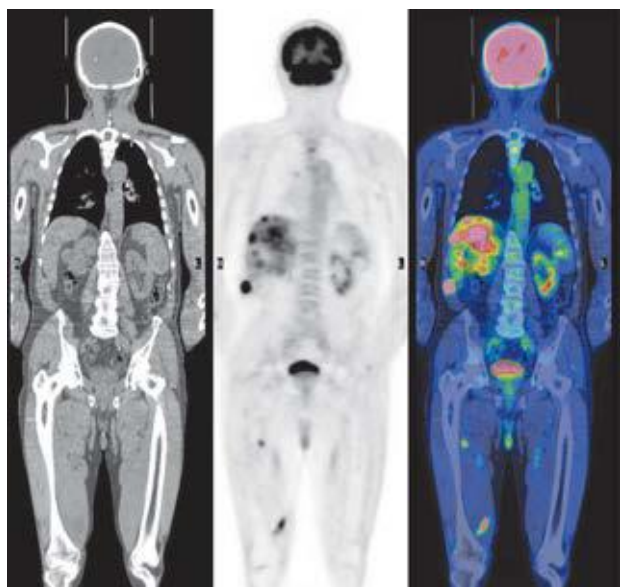



**FIGURA Q-3** Detecção de tecidos cancerosos por tomografia por emissão de pósitrons (PET). O paciente adulto do sexo masculino sofreu remoção cirúrgica de um câncer de pele primário (melanoma maligno). A imagem à esquerda, obtida do corpo todo por tomografia computadorizada (varredura por TC), mostra a localização dos tecidos moles e ossos. O painel central é uma varredura por PET após o paciente ter ingerido 2-flúor-2-desoxiglicose (FdG) marcada com $^{18}$F. Os pontos escuros indicam regiões de alta utilização da glicose. Como esperado, o cérebro e a bexiga estão fortemente marcados – o cérebro porque utiliza a maior parte da glicose consumida pelo corpo, e a bexiga porque o 6-fosfo-FdG marcado com $^{18}$F é excretado na urina. Quando a intensidade da marcação na varredura por PET é traduzida em cor falsa (a intensidade aumenta de verde para amarelo para vermelho) e a imagem é sobreposta à varredura por TC, a imagem resultante (direita) revela câncer nos ossos da coluna vertebral superior, no fígado e em algumas regiões musculares, todos resultantes da propagação do melanoma maligno primário.

Treinado em química de carboidratos no laboratório do notável Emil Fischer (que recebeu o Prêmio Nobel em Química em 1902), Warburg ganhou o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1931. Vários dos estudantes e colaboradores de Warburg também foram agraciados com Prêmios Nobel: Otto Meyerhof em 1922, Hans Krebs e Fritz Lipmann em 1953 e Hugo Theorell em 1955. O laboratório de Meyerhof forneceu treinamento para Lipmann e para muitos outros ganhadores do Prêmio Nobel: Severo Ochoa (1959), Andre Lwoff (1965) e George Wald (1967).

### A captação da glicose é deficiente no diabetes melito tipo 1

O metabolismo de glicose em mamíferos é limitado pela taxa de captação da glicose pelas células e sua fosforilação pela hexocinase. A captação da glicose do sangue é mediada pela família GLUT de transportadores de glicose (ver Tabela 11-3). Os transportadores nos hepatócitos (GLUT1, GLUT2) e nos neurônios cerebrais (GLUT3) estão sempre presentes nas membranas plasmáticas. Por outro lado, o principal transportador de glicose nas células do músculo esquelético, músculo cardíaco e tecido adiposo (GLUT4) está armazenado em pequenas vesículas intracelulares e se desloca para a membrana plasmática apenas em resposta a um sinal de insulina (**Figura 14-10**). Esse mecanismo de sinalização da insulina foi discutido no Capítulo 12 (ver Figura 12-16). Portanto, em músculo esquelético, coração e tecido adiposo, a captação e o metabolismo da glicose dependem da liberação normal de insulina pelas células $\beta$ pancreáticas em resposta à quantidade elevada de glicose no sangue (ver Figura 23-26).

Os indivíduos com diabetes melito tipo 1 (também chamado de diabetes dependente de insulina) têm pouquíssimas células $\beta$ e são incapazes de liberar insulina suficiente para desencadear a captação de glicose pelas células do músculo esquelético, do coração ou do tecido adiposo. Assim, após uma refeição contendo carboidratos, a glicose se acumula a níveis anormalmente altos no sangue, condição conhecida como hiperglicemia. Incapazes de captar glicose, o músculo e o tecido adiposo utilizam os ácidos graxos armazenados nos triacilgliceróis como seu principal combustível. No fígado, a acetil-CoA derivada da degradação desses ácidos graxos é convertida a "corpos cetônicos" – acetoacetato e $\beta$-hidroxibutirato – que são exportados e levados a outros tecidos para serem utilizados como combustível (Capítulo 17). Esses compostos são especialmente críticos para o cérebro, que utiliza os corpos cetônicos como combustível alternativo quando glicose está indisponível. (Os ácidos graxos não conseguem atravessar a barreira hematoencefálica e, por isso, não servem de combustível para os neurônios do cérebro.)

Em pacientes com diabetes tipo 1 não tratados, a superprodução de acetoacetato e $\beta$-hidroxibutirato leva a seu acúmulo no sangue, e a consequente redução do pH sanguíneo leva à **cetoacidose**, uma condição potencialmente letal. A administração de insulina reverte esta sequência de eventos: GLUT4 se desloca para a membrana plasmática dos hepatócitos e adipócitos, a glicose é captada e fosforilada por essas células, e o nível de glicose no sangue decresce, reduzindo potencialmente a produção de corpos cetônicos.

O diabetes melito tem efeitos profundos no metabolismo de carboidratos e lipídeos. Esse tópico será retomado no Capítulo 23, após considerar o metabolismo de lipídeos (Capítulos 17 e 21). ■

### RESUMO 14.1 Glicólise

- A glicólise é uma via quase universal pela qual uma molécula de glicose é oxidada a duas moléculas de piruvato, com energia conservada na forma de ATP e NADH.
- As 10 enzimas glicolíticas estão no citosol, e os 10 intermediários são compostos fosforilados de três ou seis carbonos.
- Na fase preparatória da glicólise, ATP é consumido para a conversão de glicose em frutose-1,6-bifosfato. A ligação entre C-3 e C-4 é então clivada para gerar duas moléculas de triose-fosfato.
- Na fase de pagamento, cada uma das duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato derivada da glicose sofre oxidação em C-1; a energia dessa reação de oxidação é conservada na forma de um NADH e dois ATP, por triose-fosfato oxidada. A equação para o processo global é

$$\text{Glicose} + 2\text{NAD}^+ + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i \longrightarrow 2\text{ piruvato} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$$

- A glicólise é rigidamente regulada de forma coordenada com outras vias geradoras de energia para garantir um suprimento constante de ATP.
- No diabetes tipo 1, a captação deficiente de glicose pelo músculo e tecido adiposo tem efeitos profundos sobre o metabolismo de carboidratos e gorduras.

## 14.2 Vias alimentadoras da glicólise

Muitos carboidratos, além da glicose, encontram seus destinos catabólicos na glicólise, após serem transformados em um dos intermediários glicolíticos. Os mais significativos são os polissacarídeos de armazenamento, glicogênio e amido, contidos nas células (endógenos) ou obtidos da dieta; os dissacarídeos maltose, lactose, trealose e sacarose; e os monossacarídeos frutose, manose e galactose (**Figura 14-11**).

### Os polissacarídeos e os dissacarídeos da dieta sofrem hidrólise a monossacarídeos

Para a maioria dos seres humanos, o amido é a principal fonte de carboidratos na dieta (Figura 14-11). A digestão inicia na boca, onde a ***α*-amilase** salivar hidrolisa as ligações glicosídicas internas ($\alpha1\rightarrow4$) do amido, produzindo fragmentos polissacarídicos curtos ou oligossacarídeos. (Note que nessa reação de *hidrólise*, a água e não $P_i$ é a espécie atacante.) No estômago, a $\alpha$-amilase salivar é inativada pelo pH baixo, mas uma segunda forma de $\alpha$-amilase, secretada pelo pâncreas no intestino delgado,

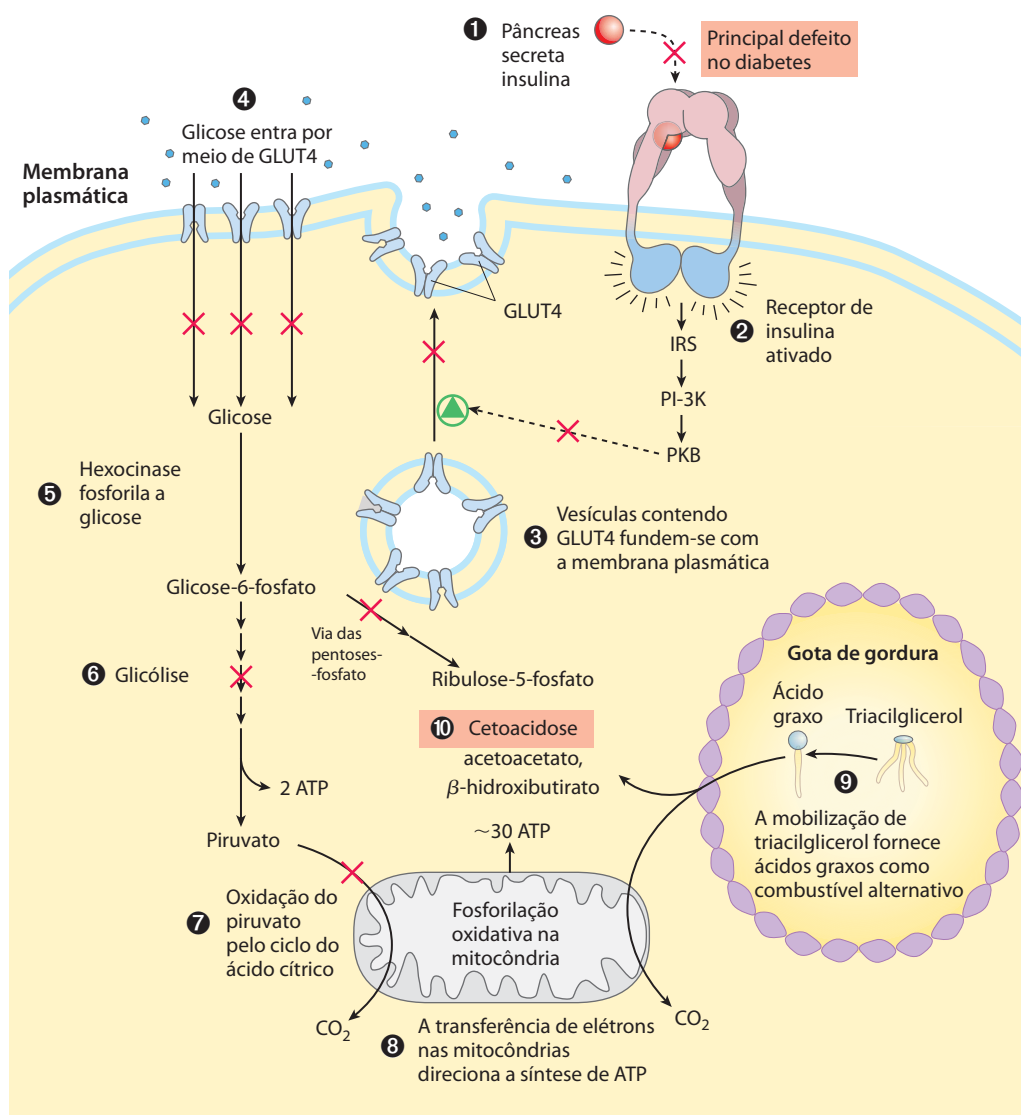



**FIGURA 14-10 Efeito do diabetes tipo 1 sobre o metabolismo dos carboidratos e das gorduras em um adipócito.** Normalmente, a insulina desencadeia a inserção de transportadores GLUT4 na membrana plasmática pela fusão de vesículas contendo GLUT4 com a membrana, permitindo a captação de glicose do sangue. Quando os níveis de insulina diminuem no sangue, GLUT4 é ressequestrado em vesículas por endocitose. No diabetes melito tipo 1 (dependente de insulina), a inserção de GLUT4 nas membranas, assim como outros processos normalmente estimulados por insulina, estão inibidos como indicado por X. A deficiência de insulina impede a captação de glicose por GLUT4; como consequência, as células são privadas de glicose, enquanto ela está elevada na corrente sanguínea. Sem glicose para o suprimento de energia, os adipócitos degradam triacilgliceróis estocados em gotas de gordura e fornecem os ácidos graxos resultantes para outros tecidos para a produção mitocondrial de ATP. Dois subprodutos da oxidação dos ácidos graxos acumulam-se no fígado (acetoacetato e $\beta$-hidroxibutirato, ver p. 686) e são liberados na corrente sanguínea, fornecendo combustível para o cérebro, mas também diminuindo o pH do sangue, causando cetoacidose. A mesma sequência de eventos ocorre no músculo, exceto que os miócitos não estocam triacilgliceróis, mas captam os ácidos graxos que são liberados na corrente sanguínea pelos adipócitos.

continua o processo de degradação. A $\alpha$-amilase pancreática gera principalmente maltose e maltotriose (os di e trissacarídeos de glicose) e oligossacarídeos chamados de dextrinas-limite, fragmentos de amilopectina contendo pontos de ramificação ($\alpha1\rightarrow6$). A maltose e as dextrinas são degradadas até glicose por enzimas do epitélio intestinal com borda em escova (as microvilosidades das células epiteliais do intestino, que aumentam muito a área da superfície intestinal). O glicogênio da dieta tem essencialmente a mesma estrutura do amido, e sua digestão segue a mesma via.

Como foi visto no Capítulo 7, a maioria dos animais não pode digerir celulose devido à falta da enzima celulase, que cliva as ligações glicosídicas ($\beta1\rightarrow4$) da celulose. Em animais ruminantes, o estômago estendido inclui uma câmara onde microrganismos simbióticos que produzem celulase degradam celulose em moléculas de glicose. Esses microrganismos utilizam a glicose resultante por meio de fermen-

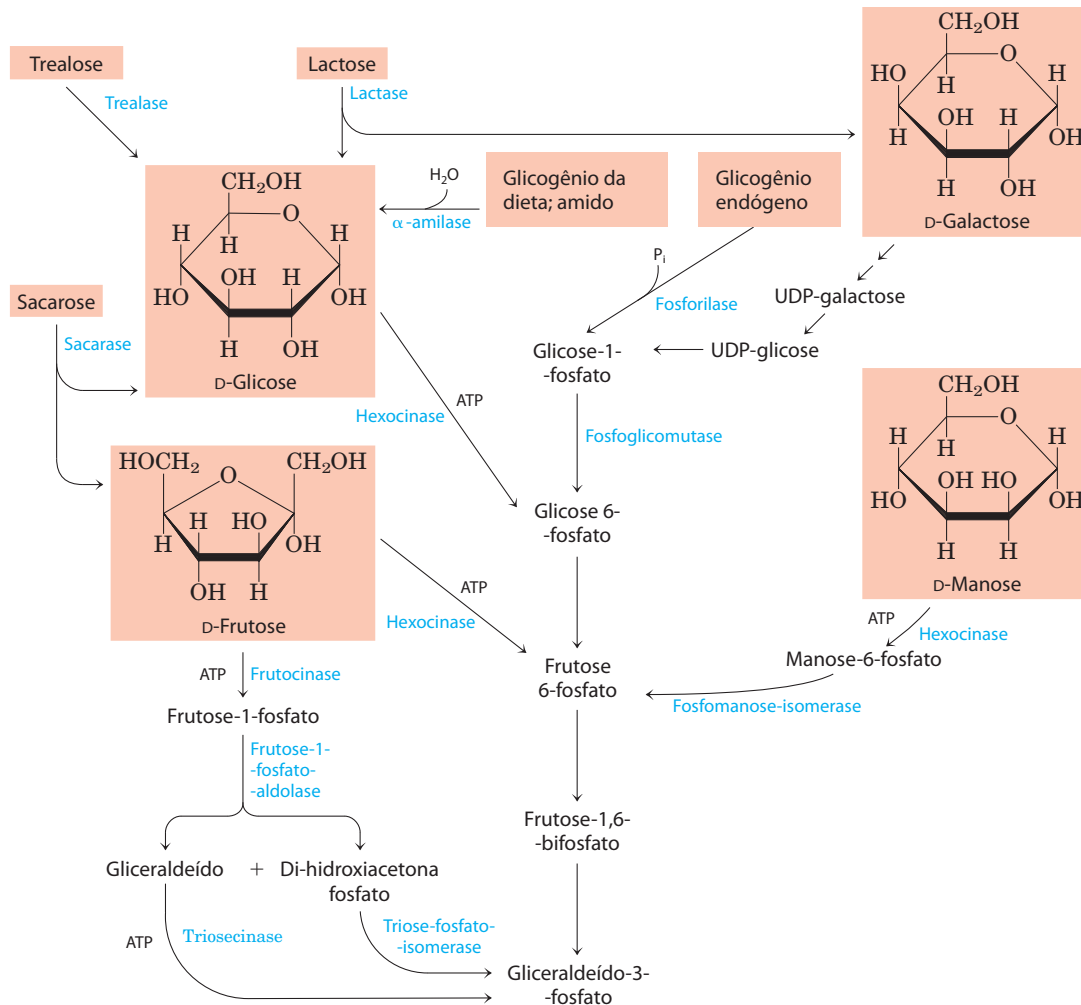



**FIGURA 14-11** **Entrada de glicogênio, amido, dissacarídeos e hexoses da dieta no estágio preparatório da glicólise.**

tação anaeróbia, produzindo grandes quantidades de propionato. Esse propionato serve como material de partida para a gliconeogênese, que gera a maior parte da lactose do leite.

## O glicogênio endógeno e o amido são degradados por fosforólise

Os estoques de glicogênio em tecidos animais (principalmente no fígado e no músculo esquelético), em microrganismos ou em tecidos vegetais podem ser mobilizados, para o uso da mesma célula, por uma reação *fosfolítica* catalisada pela **glicogênio-fosforilase** (**amido-fosforilase** em vegetais) (**Figura 14-12**). Essas enzimas catalisam o ataque por $P_i$ sobre a ligação glicosídica ($\alpha$1→4) que une os dois últimos resíduos de glicose na extremidade não redutora, gerando glicose-1-fosfato e um polímero com uma unidade de glicose a menos. A *fosforólise* preserva parte da energia da ligação glicosídica do éster-fosfato da glicose-1-fosfato. A glicogênio-fosforilase (ou amido-fosforilase) age repetidamente até alcançar um ponto de ramificação ($\alpha$1→6) (ver Figura 7-13), onde cessa sua ação. Uma **enzima de desramificação** remove as ramificações. Os mecanismos e o controle da degradação de glicogênio são descritos em maior detalhe no Capítulo 15.

A glicose-1-fosfato produzida pela glicogênio-fosforilase é convertida a glicose-6-fosfato pela **fosfoglicomutase**, que catalisa a reação reversível:

$$\text{Glicose-1-fosfato} \rightleftharpoons \text{Glicose-6-fosfato}$$

A fosfoglicomutase utiliza basicamente o mesmo mecanismo que a fosfoglicerato-mutase (Figura 14-9): ambas envolvem um intermediário bifosfato, e a enzima é transitoriamente fosforilada em cada ciclo catalítico. O nome geral **mutase** é dado a enzimas que catalisam a transferência de um grupo funcional de uma posição para outra, na mesma molécula. As mutases são uma subclasse das **isomerases**, enzimas que interconvertem estereoisômeros ou isômeros estruturais ou de posição (ver Tabela 6-3). A glicose-6-fosfato formada na reação da fosfoglicomutase pode entrar na glicólise ou em outra via, como a via das pentoses-fosfato, descrita na Seção 14.5.

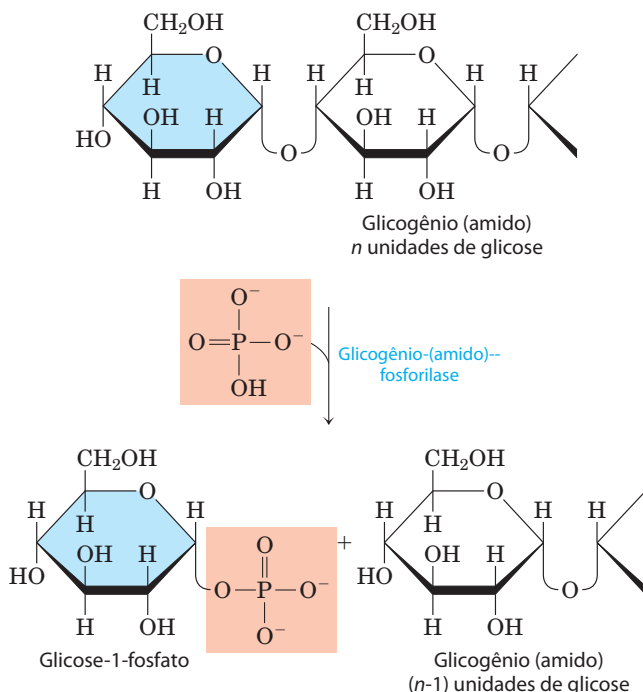



**FIGURA 14-12 Degradação do glicogênio intracelular pela glicogênio-fosforilase.** A enzima catalisa o ataque pelo fosfato inorgânico (em cor salmão) sobre o resíduo glicosil terminal (em azul) na extremidade não redutora de uma molécula de glicogênio, liberando glicose-1-fosfato e formando uma molécula de glicogênio com um resíduo de glicose a menos. A reação é uma *fosforólise* (não hidrólise).

**PROBLEMA RESOLVIDO 14-1** **Economia de energia para a quebra do glicogênio por fosforólise**

Calcule a economia de energia (em moléculas de ATP por monômeros de glicose) obtida pela quebra do glicogênio por *fosforólise* em vez de *hidrólise* para iniciar o processo de glicólise.

**Solução:** A fosforólise produz uma glicose fosforilada (glicose-1-fosfato), que é então convertida a glicose-6-fosfato – sem gasto da energia celular (1 ATP) necessária para a formação de glicose-6-fosfato a partir de glicose livre. Portanto, é consumido apenas 1 ATP por monômero de glicose na fase preparatória, em comparação com 2 ATP consumidos quando a glicólise inicia com glicose livre. Consequentemente, a célula ganha 3 ATP por monômero de glicose (4 ATP produzidos na fase de pagamento menos 1 ATP usado na fase preparatória), em vez de 2 – uma economia de 1 ATP por monômero de glicose.

A quebra de polissacarídeos da dieta, como o glicogênio e o amido, no trato gastrintestinal por fosforólise em vez de hidrólise não produziria ganho de energia: açúcares fosfatados não são transportados para dentro das células que revestem o intestino, devendo primeiro ser desfosforilados a açúcar livre.

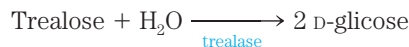
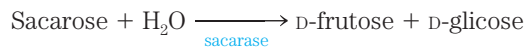
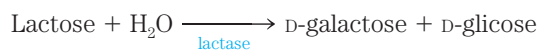
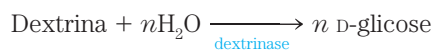
Os dissacarídeos devem ser hidrolisados a monossacarídeos antes de entrar na célula. Dissacarídeos intestinais e dextrinas são hidrolisados por enzimas acopladas à superfície externa das células epiteliais intestinais:

$$\text{Dextrina} + n\text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{dextrinase}]{} n\ \text{D-glicose}$$

$$\text{Maltose} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{maltase}]{} 2\ \text{D-glicose}$$

$$\text{Lactose} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{lactase}]{} \text{D-galactose} + \text{D-glicose}$$

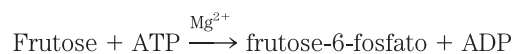
$$\text{Sacarose} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{sacarase}]{} \text{D-frutose} + \text{D-glicose}$$

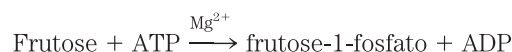
$$\text{Trealose} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{trealase}]{} 2\ \text{D-glicose}$$

Os monossacarídeos assim formados são transportados ativamente para as células epiteliais (ver Figura 11-43), em seguida passam para o sangue e são transportados para vários tecidos, onde são fosforilados e entram na sequência glicolítica.

A **intolerância à lactose**, comum entre adultos na maior parte das populações humanas, exceto aquelas originárias do norte da Europa e alguns países da África, é devida ao desaparecimento, após a infância, da maior parte ou de toda atividade lactásica das células epiteliais intestinais. Na ausência de lactase intestinal, a lactose não pode ser completamente digerida e absorvida no intestino delgado, passando para o intestino grosso, onde bactérias a convertem em produtos tóxicos que causam cãibras abdominais e diarreia. O problema é ainda mais complicado porque a lactose não digerida e seus metabólitos aumentam a osmolaridade do conteúdo intestinal, favorecendo a retenção de água no intestino. Na maioria dos lugares do mundo onde a intolerância à lactose é prevalente, o leite não é usado como alimento para adultos, embora os produtos do leite pré-digeridos com lactase estejam comercialmente disponíveis em alguns países. Em certas patologias humanas, estão ausentes algumas ou todas as dissacaridases intestinais. Nesses casos, o distúrbio digestivo ocasionado pelos dissacarídeos da dieta pode ser minimizado por uma dieta controlada. ■

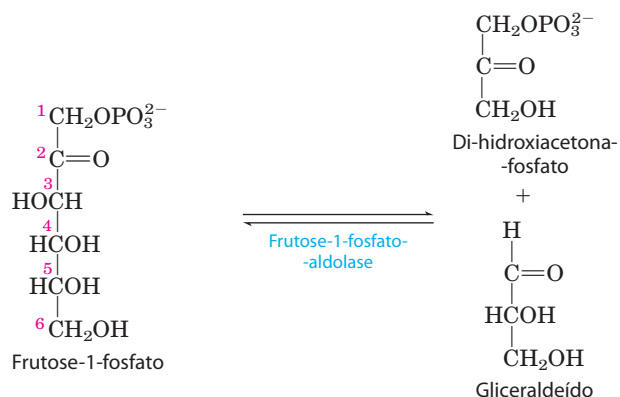
## Outros monossacarídeos entram na via glicolítica em diversos pontos

Na maior parte dos organismos, outras hexoses além da glicose podem sofrer glicólise após a conversão a um derivado fosforilado. A D-frutose, presente na forma livre em muitas frutas e formada pela hidrólise da sacarose no intestino delgado de vertebrados, é fosforilada pela hexocinase:

$$\text{Frutose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Mg}^{2+}} \text{frutose-6-fosfato} + \text{ADP}$$

Esta é a principal via de entrada da frutose na glicólise nos músculos e nos rins. No fígado, a frutose entra por uma via diferente. A enzima hepática **frutocinase** catalisa a fosforilação da frutose em C-1 em vez de C-6:

$$\text{Frutose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Mg}^{2+}} \text{frutose-1-fosfato} + \text{ADP}$$

A frutose-1-fosfato é então clivada a gliceraldeído e di-hidroxiacetona-fosfato pela **frutose-1-fosfato-aldolase**:

$^{1}CH_2OPO_3^{2-}$ — $^{2}C{=}O$ — $^{3}HOCH$ — $^{4}HCOH$ — $^{5}HCOH$ — $^{6}CH_2OH$

Frutose-1-fosfato ⇌ (Frutose-1-fosfato-aldolase) $CH_2OPO_3^{2-}$ — $C{=}O$ — $CH_2OH$ Di-hidroxiacetona-fosfato + H — $C{=}O$ — HCOH — $CH_2OH$ Gliceraldeído

A di-hidroxiacetona-fosfato é convertida a gliceraldeído-3-fosfato pela enzima glicolítica triose-fosfato-isomerase. O gliceraldeído é fosforilado pelo ATP e pela **triose-cinase** a gliceraldeído-3-fosfato:

$$\text{Gliceraldeído} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{gliceraldeído-3-fosfato} + \text{ADP}$$

Assim, os dois produtos da hidrólise da frutose-1-fosfato entram na via glicolítica como gliceraldeído-3-fosfato.

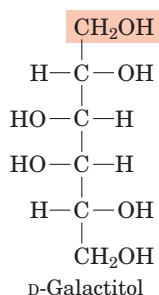
A D-galactose, produto da hidrólise da lactose (açúcar do leite), passa, pela corrente sanguínea, do intestino para o fígado, onde é primeiro fosforilada em C-1, à custa de ATP, pela enzima **galactocinase**:

$$\text{Galactose} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{galactose-1-fosfato} + \text{ADP}$$

A galactose-1-fosfato é então convertida ao seu epímero em C-4, a glicose-1-fosfato, por um conjunto de reações nas quais que o **difosfato de uridina** (UDP) funciona como coenzima transportadora de grupos hexoses (**Figura 14-13**). A epimerização envolve primeiro a oxidação do grupo —OH em C-4 para uma cetona, em seguida a redução da cetona para um —OH, com inversão da configuração em C-4. NAD é o cofator tanto para a oxidação como para a redução.

A deficiência de qualquer uma das três enzimas dessa via causa **galactosemia** em humanos. Na galactosemia por deficiência de galactocinase, altas concentrações de galactose são encontradas no sangue e na urina. Os indivíduos afetados desenvolvem catarata durante a infância, causada pela deposição no cristalino de um metabólito da galactose, o galactitol.

$CH_2OH$ — H—C—OH — HO—C—H — HO—C—H — H—C—OH — $CH_2OH$

D-Galactitol

Os outros sintomas dessa patologia são relativamente leves, e a limitação rigorosa de galactose na dieta diminui de modo significativo sua severidade.

A galactosemia por deficiência da transferase é mais séria; ela é caracterizada por retardo do crescimento na infância, anormalidade na fala, deficiência mental e dano

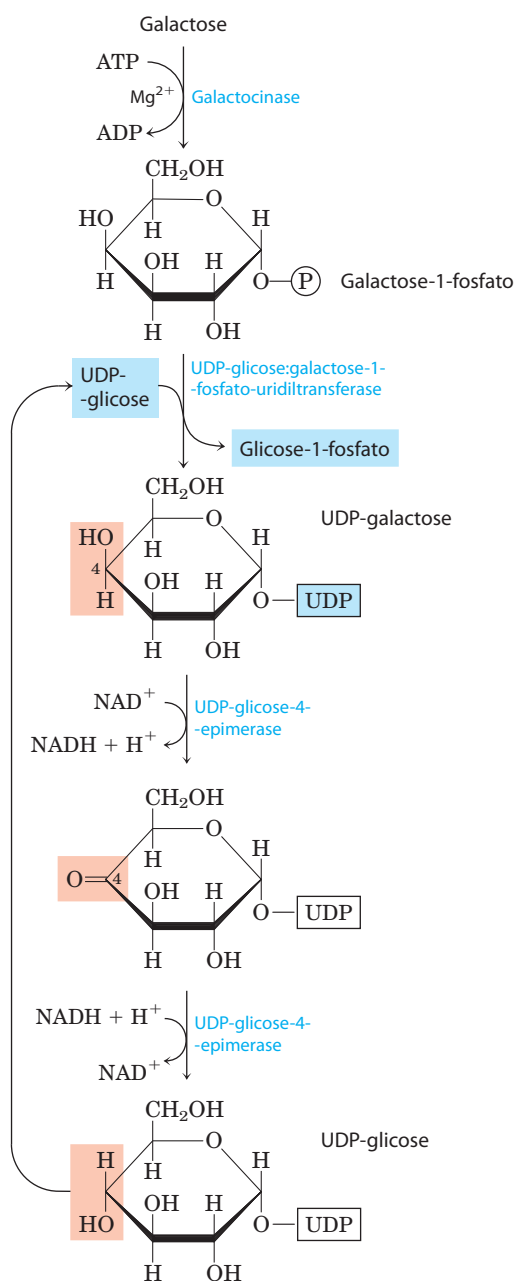



**FIGURA 14-13 Conversão da galactose em glicose-1-fosfato.** A conversão ocorre por meio de um derivado açúcar-nucleotídeo, a UDP-galactose, que é formado quando galactose-1-fosfato desloca glicose-1-fosfato da UDP-glicose. A UDP-galactose é então convertida pela UDP-glicose-4-epimerase a UDP-glicose, em uma reação que envolve a oxidação de C-4 (em cor salmão) pelo $NAD^+$, e então a redução de C-4 por NADH; o resultado é a inversão da configuração em C-4. A UDP-glicose é regenerada por meio de um novo ciclo das mesmas reações. O efeito líquido desse ciclo é a conversão de galactose-1-fosfato a glicose-1-fosfato; não há produção ou consumo líquido de UDP-glicose ou UDP-galactose.

hepático que pode ser fatal, mesmo quando a galactose é retirada da dieta. A galactosemia por deficiência da epimerase leva a sintomas similares, porém é menos grave quando a galactose da dieta é cuidadosamente controlada. ■

A D-manose, liberada na ingestão de vários polissacarídeos e glicoproteínas dos alimentos, pode ser fosforilada em C-6 pela hexocinase:

$$\text{Manose} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{manose-6-fosfato} + \text{ADP}$$

A manose-6-fosfato é isomerizada pela **fosfomanose-isomerase**, gerando frutose-6-fosfato, intermediário da glicólise.

## RESUMO 14.2 Vias alimentadoras da glicólise

- O glicogênio e o amido endógenos, as formas de armazenamento da glicose, entram na glicólise em um processo de duas etapas. A clivagem fosforolítica de um resíduo de glicose de uma extremidade do polímero, formando glicose-1-fosfato, é catalisada pela glicogênio-fosforilase ou pela amido-fosforilase. A fosfoglicomutase então converte a glicose-1-fosfato em glicose-6-fosfato, que pode entrar na glicólise.
- Os polissacarídeos e os dissacarídeos ingeridos são convertidos a monossacarídeos por enzimas hidrolíticas intestinais, e os monossacarídeos então entram nas células intestinais e são transportados para o fígado ou para outros tecidos.
- Várias D-hexoses, incluindo a frutose, a galactose e a manose, podem entrar na glicólise. Cada uma delas é fosforilada e convertida a glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato ou frutose-1-fosfato.
- A conversão de galactose-1-fosfato a glicose-1-fosfato envolve dois derivados nucleotídicos: UDP-galactose e UDP-glicose. Defeitos genéticos em qualquer das três enzimas que catalisam a conversão de galactose em glicose-1-fosfato resultam em galactosemias de severidade variada.

# 14.3 Destinos do piruvato em condições anaeróbias: fermentação

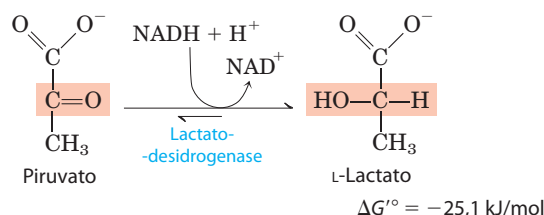
Em condições aeróbias, o piruvato formado na etapa final da glicólise é oxidado a acetato (acetil-CoA), que entra no ciclo do ácido cítrico e é oxidado a $CO_2$ e $H_2O$. O NADH formado pela desidrogenação do gliceraldeído-3-fosfato é finalmente reoxidado a $NAD^+$ pela transferência de seus elétrons ao $O_2$ na respiração mitocondrial. No entanto, em condições de hipoxia (pouco oxigênio) – assim como no músculo esquelético muito ativo, nos tecidos vegetais submersos, nos tumores sólidos ou nas bactérias lácticas – o NADH gerado pela glicólise não pode ser reoxidado pelo $O_2$. A falha na regeneração de $NAD^+$ deixaria a célula carente de aceptor de elétrons para a oxidação de gliceraldeído-3-fosfato, e as reações geradoras de energia da glicólise cessariam. Portanto, $NAD^+$ deve ser regenerado de outra forma.

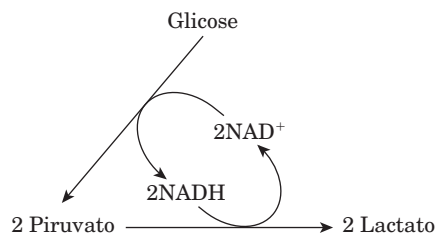
As células primitivas que viviam em uma atmosfera praticamente desprovida de oxigênio tiveram que desenvolver estratégias para extrair energia de moléculas combustíveis em condições anaeróbias. A maioria dos organismos modernos reteve a capacidade de regenerar $NAD^+$ continuamente durante a glicólise anaeróbia pela transferência de elétrons do NADH para formar um produto final reduzido, como lactato ou etanol.

## O piruvato é o receptor final de elétrons na fermentação láctica

Quando tecidos animais não podem ser supridos com oxigênio suficiente para realizar a oxidação aeróbia do piruvato e do NADH produzidos na glicólise, $NAD^+$ é regenerado a partir de NADH pela redução do piruvato a **lactato**. Como mencionado antes, alguns tecidos e tipos celulares (como os eritrócitos, que não possuem mitocôndria e, portanto, não podem oxidar piruvato até $CO_2$) produzem lactato a partir de glicose mesmo em condições aeróbias. A redução do piruvato por essa via é catalisada pela **lactato-desidrogenase**, que forma o isômero L do lactato em pH 7:

Piruvato ($CH_3$—C(=O)—$COO^-$) + NADH + $H^+$ ⇌ (Lactato-desidrogenase) L-Lactato ($CH_3$—CH(OH)—$COO^-$) + $NAD^+$

$\Delta G'^{\circ} = -25{,}1$ kJ/mol

O equilíbrio global da reação favorece bastante a formação de lactato, como mostrado pela grande variação negativa da energia livre padrão.

Na glicólise, a desidrogenação de duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato derivado de cada molécula de glicose converte duas moléculas de $NAD^+$ a duas de NADH. Como a redução de duas moléculas de piruvato em duas de lactato regenera duas moléculas de $NAD^+$, não ocorre variação líquida de $NAD^+$ ou NADH:

O lactato formado pelo músculo esquelético em atividade (ou pelos eritrócitos) pode ser reciclado; ele é transportado pelo sangue até o fígado, onde é convertido em glicose durante a recuperação da atividade muscular exaustiva. Quando o lactato é produzido em grande quantidade durante a contração muscular vigorosa (p. ex., durante uma arrancada), a acidificação resultante da ionização do ácido láctico nos músculos e no sangue limita o período de atividade vigorosa. Os atletas mais bem condicionados só podem correr por um minuto em velocidade máxima (Quadro 14-2).

## QUADRO 14-2 Atletas, jacarés e celacantos: glicólise em concentrações limitantes de oxigênio

Os vertebrados são em sua maior parte organismos essencialmente aeróbios: eles convertem glicose em piruvato pela glicólise, depois utilizam o oxigênio molecular para oxidar o piruvato a $CO_2$ e $H_2O$. O catabolismo anaeróbio da glicose a lactato ocorre durante curtos pulsos de atividade muscular extrema, por exemplo, em uma corrida de 100 m, durante a qual o oxigênio não pode ser transportado para os músculos com a rapidez suficiente para oxidar o piruvato. Assim, os músculos utilizam seus estoques de glicose (glicogênio) como combustível para gerar ATP por fermentação, com lactato como produto final. Na arrancada de uma corrida, a concentração de lactato no sangue aumenta muito. No fígado, ele é lentamente convertido em glicose pela gliconeogênese no período de descanso ou recuperação, quando, então, o oxigênio é consumido em taxas gradualmente menores até a velocidade da respiração retornar ao normal. O excesso de oxigênio consumido no período de recuperação representa a reposição do débito de oxigênio. Essa é a quantidade de oxigênio necessária para suprir ATP para a gliconeogênese durante a recuperação da respiração, para regenerar o glicogênio "tomado emprestado" do fígado e do músculo para realizar atividade muscular intensa na corrida de velocidade. O ciclo de reações que incluem a conversão de glicose em lactato no músculo e a conversão de lactato em glicose no fígado é chamado de ciclo de Cori, em homenagem a Carl e Gerty Cori, cujos estudos, nas décadas de 1930 e 1940, elucidaram a via e seu papel (ver Quadro 15-4).

O sistema circulatório da maioria dos vertebrados pequenos consegue transportar oxigênio para os músculos com rapidez suficiente para evitar o uso anaeróbio de glicogênio muscular. Por exemplo, os pássaros migrantes com frequência voam grandes distâncias em alta velocidade sem descansar e sem incorrer em débito de oxigênio. Muitos animais velozes de tamanho moderado também mantêm essencialmente um metabolismo aeróbio em seus músculos esqueléticos. No entanto, o sistema circulatório de animais de grande porte, incluindo o homem, não consegue sustentar o metabolismo aeróbio nos músculos esqueléticos por longos períodos de atividade muscular intensa. Esses animais em geral movem-se lentamente em circunstâncias normais e desenvolvem atividade muscular intensa apenas em emergências muito graves, já que tal pulso de atividade requer longo período de recuperação para repor o débito de oxigênio.

Os jacarés e os crocodilos, por exemplo, são normalmente animais lentos. No entanto, quando provocados, eles sofrem mudanças à velocidade da luz e podem dar chicotadas violentas com suas caudas poderosas. Esses pulsos de atividade intensa são curtos e devem ser seguidos por longos períodos de recuperação. Os movimentos rápidos de emergência requerem fermentação láctica para gerar ATP nos músculos esqueléticos. Os estoques musculares de glicogênio são rapidamente consumidos na atividade muscular intensa, e o lactato atinge concentrações muito altas em miócitos e no fluido extracelular. Enquanto um atleta treinado pode se recuperar de uma corrida de 100 m em 30 minutos ou menos, um jacaré pode precisar de muitas horas de descanso e de consumo extra de oxigênio para limpar o excesso de lactato de seu sangue e regenerar o glicogênio muscular após um pulso de atividade.

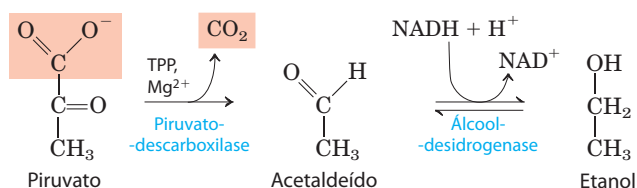
Outros animais de grande porte, como os elefantes e os rinocerontes, têm características metabólicas similares às dos mamíferos aquáticos, como as baleias e as focas. Os dinossauros e outros animais de porte enorme, agora extintos, provavelmente dependiam da fermentação láctica para fornecer energia para a atividade muscular, seguida de períodos muito longos de recuperação em que ficavam vulneráveis ao ataque por predadores menores, mais capazes de utilizar oxigênio e, assim, mais bem adaptados para atividades musculares contínuas e sustentadas.

Explorações do alto-mar revelaram muitas espécies de vida marinha em grandes profundidades oceânicas, onde a concentração de oxigênio é quase zero. Por exemplo, o celacanto primitivo, peixe grande encontrado em profundidades de 4.000 m ou mais na costa da África do Sul, tem metabolismo essencialmente anaeróbio em quase todos os tecidos. Ele converte carboidratos em lactato e em outros produtos, sendo que a maior parte deles deve ser excretada. Alguns vertebrados marinhos fermentam glicose a etanol e $CO_2$ para gerar ATP.

Embora a conversão de glicose em lactato compreenda duas etapas de oxidação-redução, não ocorre variação líquida no estado de oxidação do carbono; na glicose ($C_6H_{12}O_6$) e no ácido láctico ($C_3H_6O_3$), a relação H:C é a mesma. Todavia, parte da energia da molécula da glicose é extraída pela sua conversão em lactato – o suficiente para dar um rendimento líquido de duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose consumida. **Fermentação** é o termo geral para esse processo, que extrai energia (como ATP) mas não consome oxigênio nem varia as concentrações de $NAD^+$ ou NADH. As fermentações são realizadas por uma grande variedade de organismos, muitos deles ocupando nichos anaeróbios e produzindo diversos produtos finais, alguns com aproveitamento comercial.

## O etanol é o produto reduzido na fermentação alcoólica

Leveduras e outros microrganismos fermentam glicose em etanol e $CO_2$, em vez de lactato. A glicose é convertida a piruvato pela glicólise, e o piruvato é convertido a etanol e $CO_2$ em um processo de duas etapas:

Piruvato $\xrightarrow[\text{Piruvato-descarboxilase}]{\text{TPP, } Mg^{2+}}$ $CO_2$ + Acetaldeído $\underset{\text{Álcool-desidrogenase}}{\overset{NADH + H^+ \;\to\; NAD^+}{\rightleftharpoons}}$ Etanol

Na primeira etapa, o piruvato é descarboxilado em uma reação irreversível catalisada pela **piruvato-descarboxilase**. Essa reação é uma descarboxilação simples e não envolve a oxidação do piruvato. A piruvato-descarboxilase requer $Mg^{2+}$ e contém uma coenzima fortemente ligada, a tiamina-pirofosfato, discutida a seguir. Na segunda etapa, o acetaldeído é reduzido a etanol pela ação da **álcool-desidrogenase**, com o poder redutor fornecido pelo NADH derivado da desidrogenação do gliceraldeído-3-fosfato. Essa reação é um caso bem estudado de transferência de grupo hidreto do NADH (**Figura 14-14**). Etanol e $CO_2$ são então os produtos finais da fermentação etanólica, e a equação geral é:

$$\text{Glicose} + 2ADP + 2P_i \rightarrow 2\ \text{etanol} + 2CO_2 + 2ATP + 2H_2O$$

Como na fermentação láctica, não existe variação líquida na razão entre átomos de hidrogênio e carbono quando a glicose (razão H:C = 12/6 = 2) é fermentada a duas moléculas de etanol e duas de $CO_2$ (razão H:C combinada=12/6=2). Em todas as fermentações, a razão H:C dos reagentes e dos produtos permanece a mesma.

A piruvato-descarboxilase está presente na levedura utilizada para fabricação de cerveja e pão (*Saccharomyces cerevisiae*) e em todos os organismos que fermentam glicose em etanol, incluindo algumas plantas. O $CO_2$ produzido pela piruvato-descarboxilase na levedura da cerveja é responsável pela efervescência característica do champanhe. A antiga arte de fazer cerveja envolve vários processos enzimáticos além das reações da fermentação alcoólica (Quadro 14-3). Na panificação, o $CO_2$ liberado pela piruvato-descarboxilase, quando a levedura é misturada com

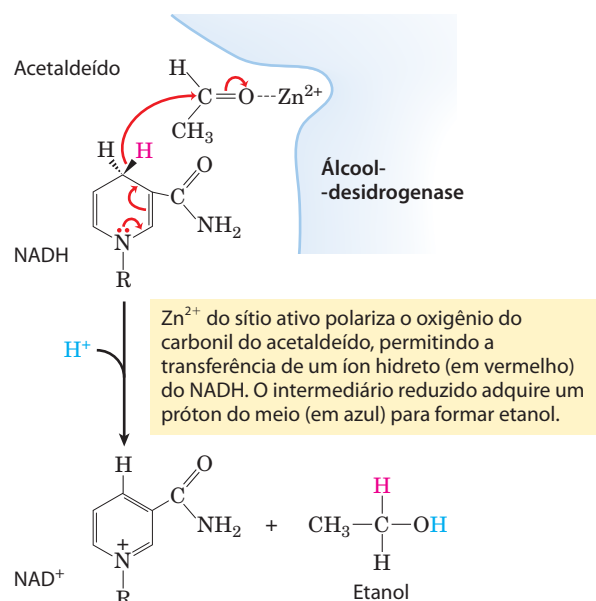



**FIGURA 14-14 A reação da álcool-desidrogenase.** Mecanismo da álcool-desidrogenase

o açúcar fermentável, faz a massa crescer. A enzima está ausente em tecidos de vertebrados e em outros organismos que realizam fermentação láctica.

A álcool-desidrogenase está presente em muitos organismos que metabolizam etanol, incluindo o homem. No fígado ela catalisa a oxidação do etanol ingerido ou produzido por microrganismos intestinais, com a concomitante redução de $NAD^+$ a NADH. Nesse caso, a reação segue no sentido oposto àquele envolvido na produção de etanol pela fermentação.

## A tiamina-pirofosfato transporta grupos "acetaldeído ativos"

A reação da piruvato-descarboxilase proporciona nosso primeiro encontro com a **tiamina-pirofosfato** (**TPP**) (**Figura 14-15**), coenzima derivada da vitamina $B_1$. A deficiência de vitamina $B_1$ na dieta humana leva a uma patologia conhecida como beribéri, caracterizada pelo acúmulo de fluidos corporais (inchaço), dor, paralisia e, em última instância, morte. ■

A tiamina-pirofosfato exerce um papel importante na clivagem de ligações adjacentes ao grupo carboxila, como a descarboxilação de α-cetoácidos, e em rearranjos químicos em que um grupo acetaldeído ativado é transferido de um átomo de carbono para outro (Tabela 14-1). A porção funcional da TPP, o anel tiazólico, contém um próton relativamente ácido em C-2. A perda desse próton produz um carbânion, que é a espécie ativa nas reações dependentes de TPP (Figura 14-15). O carbânion liga-se prontamente ao grupo carbonil, e o anel tiazólico está, consequentemente, posicionado para atuar como "escoadouro de elétrons", o que facilita grandemente as reações, como a descarboxilação catalisada pela piruvato-descarboxilase.

**QUADRO 14-3 Fermentações etanólicas: fabricando cerveja e produzindo biocombustíveis**

A produção de cerveja foi uma ciência aprendida cedo na história da humanidade, sendo mais tarde aprimorada para a produção em larga escala. Os cervejeiros fabricam a cerveja por meio da fermentação etanólica de carboidratos presentes em grãos de cereais (sementes) como a cevada, realizada pelas enzimas glicolíticas das leveduras. Os carboidratos, grandes polissacarídeos, devem ser primeiro degradados a dissacarídeos e monossacarídeos. No processo chamado de maltagem, as sementes da cevada germinam até formarem as enzimas hidrolíticas necessárias para a quebra dos polissacarídeos. Nesse ponto, a germinação é interrompida por aquecimento controlado. O produto é o malte, o qual contém enzimas que catalisam a hidrólise das ligações $\beta$ da celulose e de outros polissacarídeos da parede celular da casca da cevada, e enzimas como a $\alpha$-amilase e a maltase.

Em seguida, o cervejeiro prepara o mosto, o meio nutriente necessário para a fermentação pelas células das leveduras. O malte é misturado com água, sendo então macerado. Isso permite que as enzimas formadas no processo de maltagem hidrolisem os polissacarídeos dos cereais para formar maltose, glicose e outros açúcares simples, solúveis em meio aquoso. O material celular restante é separado, e o mosto líquido é fervido com lúpulo para dar o sabor. O mosto é resfriado e então aerado.

Agora, são adicionadas células de levedura. No mosto aeróbio, as leveduras crescem e se reproduzem muito rapidamente, usando a energia obtida dos açúcares disponíveis. Não é formado etanol durante esse estágio, porque as leveduras, amplamente supridas com oxigênio, oxidam o piruvato formado pela glicólise em $CO_2$ e $H_2O$ por meio do ciclo do ácido cítrico. Quando todo o oxigênio dissolvido existente no tanque de fermentação do mosto tiver sido consumido, as leveduras mudam para o metabolismo anaeróbio, e a partir desse ponto elas fermentam os açúcares em etanol e $CO_2$. O processo de fermentação é controlado em parte pela concentração de etanol formado, pelo pH e pela quantidade remanescente de açúcar. Após a fermentação ter sido interrompida, as células são removidas e a cerveja "crua" está pronta para o processamento final.

Nas etapas finais da fabricação da cerveja, é ajustada a quantidade de espuma (ou colarinho), resultante de proteínas dissolvidas. Geralmente, isto é controlado por enzimas proteolíticas que surgem do processo de maltagem. Caso essas enzimas atuem sobre as proteínas por longo período de tempo, a cerveja terá colarinho muito pequeno e ficará "choca"; se elas não agirem por um tempo suficiente, a cerveja ficará turva quando gelada. Algumas vezes são adicionadas enzimas proteolíticas de outras fontes para controlar a espuma.

Grande parte da tecnologia desenvolvida para a produção de bebidas alcoólicas em larga escala encontra aplicação em um problema inteiramente diferente: a produção de etanol como combustível renovável. Com a redução contínua dos estoques conhecidos de combustíveis fósseis e o aumento do custo do combustível para motores de combustão interna, existe o aumento do interesse no uso de etanol como um combustível substituto ou um complemento. A principal vantagem do etanol como combustível é que ele pode ser produzido a partir de fontes relativamente *baratas* e *renováveis*, ricas em sacarose, amido ou celulose – amido de milho ou trigo, sacarose de beterraba ou cana, e celulose de palha, de resíduos de indústrias florestais ou de resíduos sólidos domésticos. Geralmente, a matéria-prima é convertida quimicamente primeiro a monossacarídeos, então fornecidos como alimento a uma linhagem robusta de levedura em um fermentador em escala industrial (Figura Q-1). A fermentação pode render não apenas etanol para combustível, mas também subprodutos como proteínas que podem ser usadas para alimentação de animais.

**FIGURA Q-1** Fermentações em escala industrial para a produção de biocombustível e outros produtos são realizadas em tanques que comportam milhares de litros de meio.

## As fermentações são usadas para produzir alguns alimentos comuns e reagentes químicos industriais

Há milênios a humanidade aprendeu a usar a fermentação na produção e na conservação de alimentos. Certos microrganismos presentes em alimentos naturais fermentam os carboidratos e geram produtos metabólicos que dão aos alimentos sua forma, textura e sabor característicos. Os iogurtes, já conhecidos no período bíblico, são produzidos quando a bactéria *Lactobacillus bulgaricus* fermenta os carboidratos do leite, produzindo ácido láctico; a diminuição do pH resultante causa a precipitação das proteínas do leite, produzindo a textura espessa e o sabor ácido do iogurte não adoçado. Outra bactéria, a *Propionibacterium freudenreichii*, fermenta o leite produzindo ácido propiônico e $CO_2$; o ácido propiônico precipita as proteínas do leite, e as bolhas de $CO_2$ formam os furos característicos do queijo suíço. Muitos outros produtos alimentares são

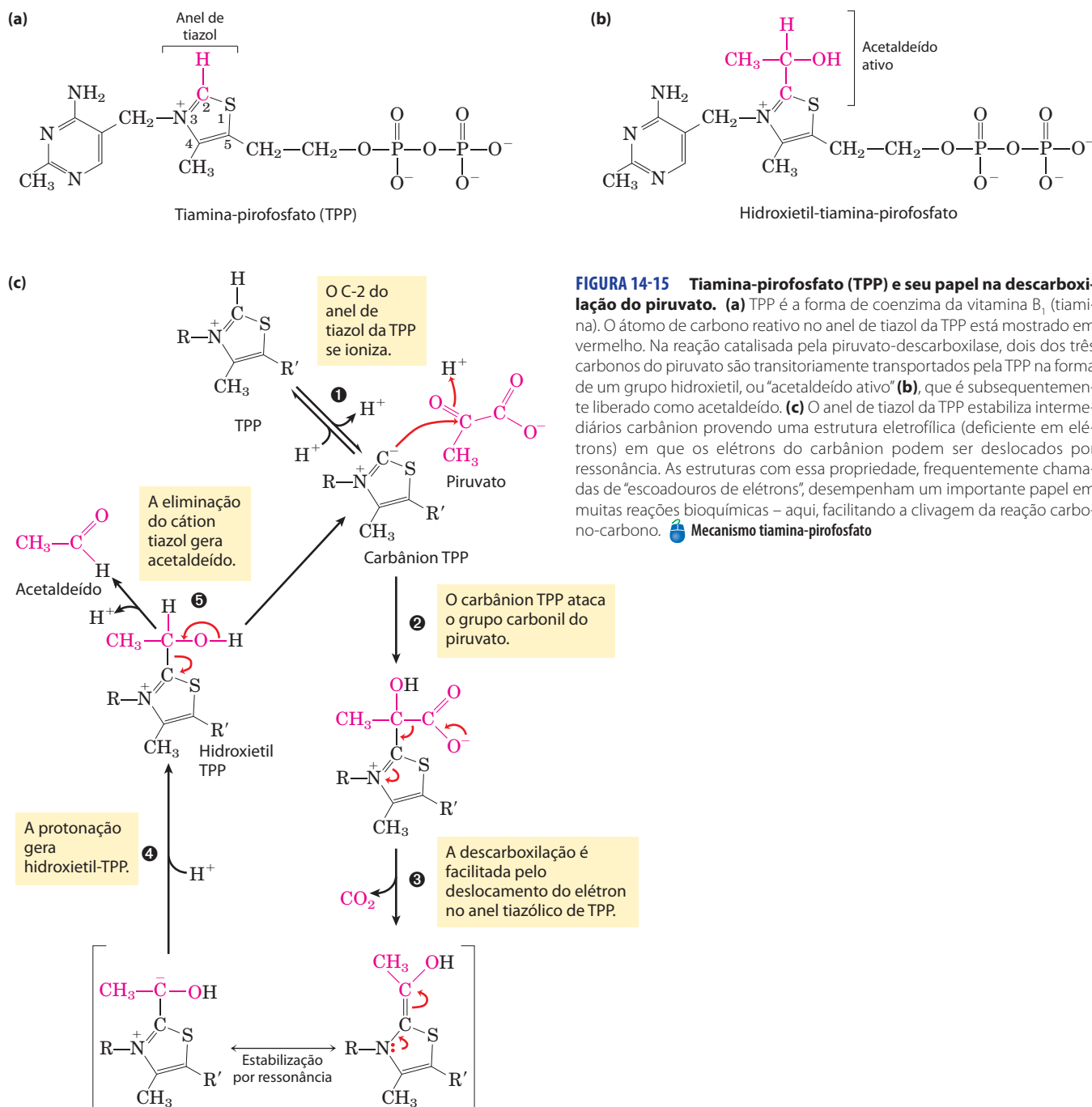



**FIGURA 14-15 Tiamina-pirofosfato (TPP) e seu papel na descarboxilação do piruvato.** **(a)** TPP é a forma de coenzima da vitamina $B_1$ (tiamina). O átomo de carbono reativo no anel de tiazol da TPP está mostrado em vermelho. Na reação catalisada pela piruvato-descarboxilase, dois dos três carbonos do piruvato são transitoriamente transportados pela TPP na forma de um grupo hidroxietil, ou "acetaldeído ativo" **(b)**, que é subsequentemente liberado como acetaldeído. **(c)** O anel de tiazol da TPP estabiliza intermediários carbânion provendo uma estrutura eletrofílica (deficiente em elétrons) em que os elétrons do carbânion podem ser deslocados por ressonância. As estruturas com essa propriedade, frequentemente chamadas de "escoadouros de elétrons", desempenham um importante papel em muitas reações bioquímicas – aqui, facilitando a clivagem da reação carbono-carbono. **Mecanismo tiamina-pirofosfato**

resultantes de fermentações: picles, chucrute, salsicha, molho de soja e uma variedade de pratos típicos, como *kimchi* (Coreia), *tempoyak* (Indonésia), *kefir* (Rússia), *dahi* (Índia) e *pozol* (México). A redução do pH associada à fermentação também ajuda a preservar os alimentos, já que a maioria dos microrganismos que causam a deterioração dos alimentos não cresce em pH baixo. Na agricultura, subprodutos vegetais, como os colmos de milho, são mantidos para o uso na alimentação de animais, sendo embalados em grandes silos com acesso de ar limitado; a fermentação microbiana produz ácidos que diminuem o pH. A silagem resultante desse processo de fermentação pode ser utilizada como alimento animal por longos períodos sem estragar.

Em 1910, Chaim Weizmann (posteriormente o primeiro presidente de Israel) descobriu que a bactéria *Clostridium acetobutyricum* fermenta amido em butanol e acetona. Essa descoberta abriu o campo das fermentações industriais, em que alguns materiais facilmente disponíveis, ricos em carboidratos (p. ex., amido de milho, ou melaço), são fornecidos a uma cultura pura de microrganismos específicos, que os fermenta a um produto de valor comercial

**TABELA 14-1** Algumas reações dependentes de TPP

| Enzima | Via(s) | Ligação clivada | Ligação formada |
|---|---|---|---|
| Piruvato-descarboxilase | Fermentação alcoólica | $R^1{-}C(=O){-}C(=O)O^-$ | $R^1{-}C(=O){-}H$ |
| Piruvato-desidrogenase<br>α-Cetoglutarato-desidrogenase | Síntese de acetil-CoA<br>Ciclo do ácido cítrico | $R^2{-}C(=O){-}C(=O)O^-$ | $R^2{-}C(=O){-}S\text{-}CoA$ |
| Transcetolase | Reações de fixação de carbono<br>Via das pentoses-fosfato | $R^3{-}C(=O){-}CH(OH){-}R^4$ | $R^3{-}C(=O){-}CH(OH){-}R^5$ |

maior. O etanol usado para fazer *gasohol* (mistura de 10% de etanol e 90% de gasolina) é produzido por fermentação microbiológica, assim como os ácidos fórmico, acético, propiônico, butírico e succínico, e os álcoois glicerol, metanol, isopropanol, butanol e butanediol. Em geral, essas fermentações são desenvolvidas em grandes tanques fechados em que a temperatura e o acesso de ar são controlados para favorecer a multiplicação dos organismos desejados e excluir organismos contaminantes. A beleza das fermentações industriais está no fato de que as transformações químicas complexas e de múltiplas etapas são realizadas com grande rendimento e com poucos subprodutos, por fábricas químicas que se autorreproduzem – as células microbianas. Para algumas fermentações industriais, foi desenvolvida a tecnologia para imobilizar as células em um suporte inerte, passar a matéria-prima continuamente pelo leito de células imobilizadas, e coletar o produto desejado no efluente – um sonho dos engenheiros!

### RESUMO 14.3 Destinos do piruvato em condições anaeróbias: fermentação

- O NADH formado na glicólise deve ser reciclado para regenerar $NAD^+$, necessário como receptor de elétrons na primeira etapa da fase de pagamento. Em condições aeróbias, os elétrons passam do NADH para o $O_2$ na respiração mitocondrial.
- Em condições anaeróbias ou de hipoxia, muitos organismos regeneram $NAD^+$ pelo transporte de elétrons do NADH para o piruvato, formando lactato. Outros organismos, como as leveduras, regeneram $NAD^+$ pela redução de piruvato em etanol e $CO_2$. Nesses processos anaeróbios (fermentações), não ocorre oxidação ou redução líquida dos carbonos da glicose.
- Uma grande variedade de microrganismos pode fermentar o açúcar de alimentos frescos, resultando em mudanças de pH, sabor e textura, protegendo os alimentos da deterioração. As fermentações são usadas na indústria para produzir uma ampla variedade de compostos orgânicos comercialmente valiosos a partir de matérias-primas baratas.

## 14.4 Gliconeogênese

O papel central da glicose no metabolismo surgiu cedo na evolução, e esse açúcar permanece sendo combustível quase universal e unidade estrutural nos organismos atuais, desde micróbios até humanos. Em mamíferos, alguns tecidos dependem quase completamente de glicose para sua energia metabólica. Para o cérebro humano e o sistema nervoso, assim como para os eritrócitos, os testículos, a medula renal e os tecidos embrionários, a glicose do sangue é a principal ou a única fonte de combustível. Apenas o cérebro requer em média 120 g de glicose por dia – mais da metade de toda a glicose estocada como glicogênio nos músculos e no fígado. No entanto, o suprimento de glicose a partir desses estoques não é sempre suficiente; entre as refeições e durante períodos de jejum mais longos, ou após exercício vigoroso, o glicogênio se esgota. Para esses períodos, os organismos precisam de um método para sintetizar glicose a partir de precursores que não são carboidratos. Isso é realizado por uma via chamada de **gliconeogênese** ("nova formação de açúcar"), que converte em glicose o piruvato e os compostos relacionados, com três e quatro carbonos.

A gliconeogênese ocorre em todos os animais, vegetais, fungos e microrganismos. As reações são essencialmente as mesmas em todos os tecidos e em todas as espécies. Os precursores importantes da glicose em animais são compostos de três carbonos como o lactato, o piruvato e o glicerol, assim como certos aminoácidos (**Figura 14-16**). Em mamíferos, a gliconeogênese ocorre principalmente no fígado, e em menor extensão no córtex renal e nas células epiteliais que revestem internamente o intestino delgado. A glicose assim produzida passa para o sangue e vai suprir outros tecidos. Após exercícios vigorosos, o lactato produzido pela glicólise anaeróbia no músculo esquelético retorna para o fígado e é convertido a glicose, que volta para os músculos e é convertida a glicogênio – circuito chamado de ciclo de Cori (Quadro 14-2; ver também Figura 23-19). Em plantas oriundas de sementes, as gorduras e as proteínas estocadas nas sementes são convertidas, por vias que incluem a gliconeogênese, ao dissacarídeo sacarose para o transporte ao longo da planta em desenvolvimento. A glicose e seus derivados são precursores para a síntese da parede celular,

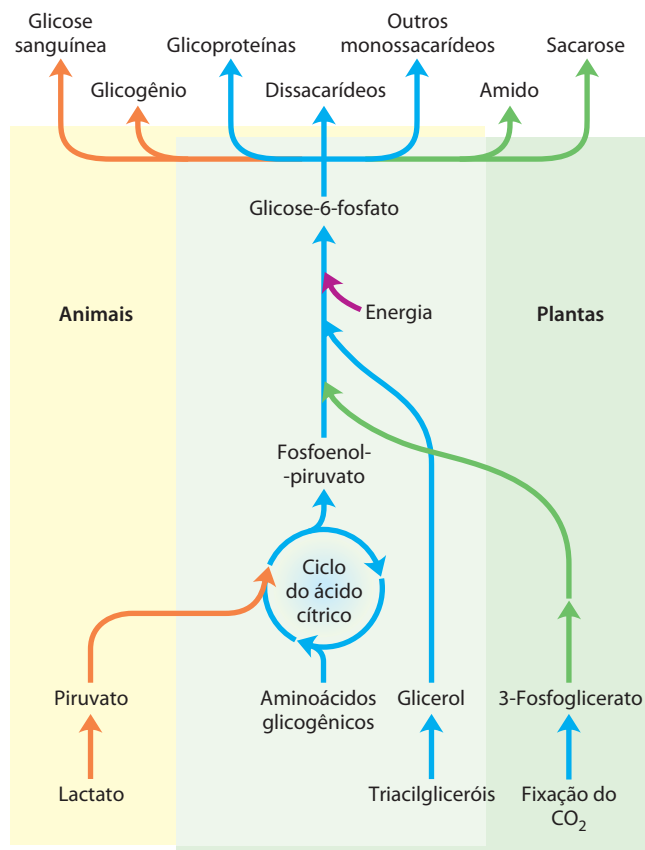



**FIGURA 14-16 Síntese de carboidratos a partir de precursores simples.** A via a partir de fosfoenolpiruvato até glicose-6-fosfato é comum para a conversão biossintética de muitos precursores diferentes de carboidratos de animais e plantas. A via partindo de piruvato a fosfoenolpiruvato passa por oxaloacetato, um intermediário do ciclo do ácido cítrico, discutido no Capítulo 16. Qualquer composto que possa ser convertido a piruvato ou oxaloacetato pode, consequentemente, servir como material inicial para a gliconeogênese. Isso inclui alanina e aspartato, que podem ser convertidos a piruvato e oxaloacetato, respectivamente, e outros aminoácidos que também podem gerar fragmentos de três ou quatro carbonos, os chamados aminoácidos glicogênicos (ver Tabela 14-4; ver também Figura 18-15). Plantas e bactérias fotossintetizantes são as únicas capazes de converter $CO_2$ em carboidratos, usando o ciclo de Calvin (ver Seção 20.1).

nucleotídeos, coenzimas e uma série de outros metabólitos essenciais das plantas. Em muitos microrganismos, a gliconeogênese inicia a partir de compostos orgânicos simples de dois ou três carbonos, como acetato, lactato e propionato, presentes em seu meio de crescimento.

Embora as reações da gliconeogênese sejam as mesmas em todos os organismos, o contexto metabólico e a regulação da via diferem de uma espécie para outra e de tecido para tecido. Nesta seção, analisa-se a gliconeogênese e como ela ocorre no fígado de mamíferos. No Capítulo 20 é mostrado como organismos fotossintéticos usam essa via para converter os produtos primários da fotossíntese em glicose, para ser estocada como sacarose ou amido.

A gliconeogênese e a glicólise não são vias idênticas correndo em direções opostas, embora compartilhem várias etapas (**Figura 14-17**); sete das 10 reações enzimáticas da gliconeogênese são o inverso das reações glicolíticas. No

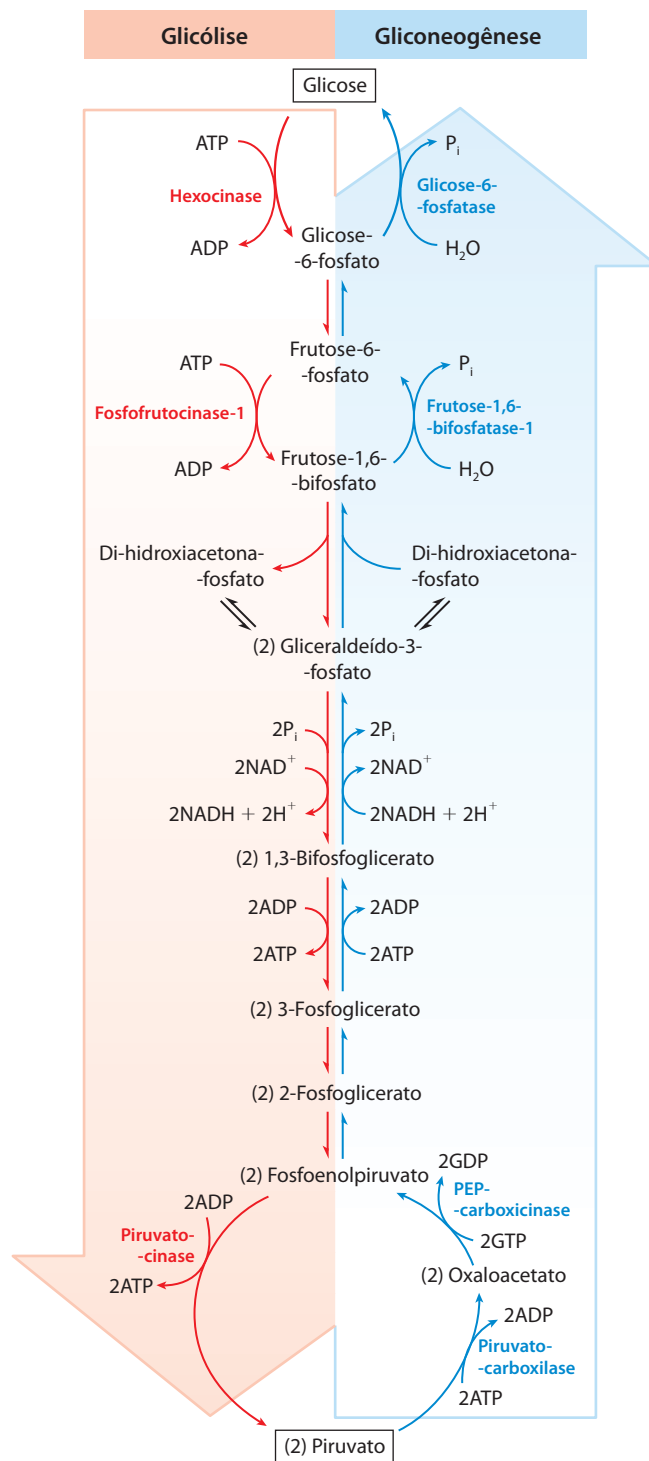



**FIGURA 14-17 Vias opostas da glicólise e da gliconeogênese em fígado de rato.** As reações da glicólise estão do lado esquerdo, em vermelho; a via oposta, a gliconeogênese, está mostrada do lado direito, em azul. Os principais pontos de regulação da gliconeogênese representados aqui são discutidos posteriormente neste capítulo e em detalhe no Capítulo 15. A Figura 14-20 ilustra uma rota alternativa para a produção de oxaloacetato na mitocôndria.

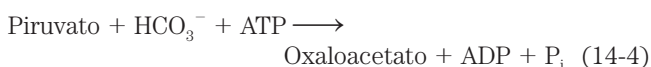
entanto, três reações da glicólise são essencialmente irreversíveis e não podem ser utilizadas na gliconeogênese: a conversão de glicose em glicose-6-fosfato pela hexocinase, a fosforilação da frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bifosfato pela fosfofrutocinase-1 e a conversão de fosfoenolpiruvato em piruvato pela piruvato-cinase (Figura 14-17). Nas células, essas três reações são caracterizadas por uma grande variação negativa da energia livre, enquanto outras reações glicolíticas têm $\Delta G$ próximo de zero (Tabela 14-2). Na gliconeogênese, as três etapas irreversíveis são contornadas por um grupo distinto de enzimas, catalisando reações suficientemente exergônicas para serem efetivamente irreversíveis no sentido da síntese de glicose. Assim, tanto a glicólise quanto a gliconeogênese são processos irreversíveis nas células. Em animais, as duas vias ocorrem principalmente no citosol, necessitando de regulação recíproca e coordenada. A regulação separada das duas vias é atingida por meio de controles exercidos nas etapas enzimáticas existentes em apenas uma das vias.

Inicialmente, consideram-se as três reações de contorno da gliconeogênese. (Tenha em mente que "contorno" refere-se ao contorno das reações irreversíveis da via glicolítica.)

## A conversão de piruvato em fosfoenolpiruvato requer duas reações exergônicas

A primeira reação de contorno da gliconeogênese é a conversão de piruvato em fosfoenolpiruvato (PEP). Essa reação não pode ocorrer por uma simples inversão da reação da piruvato-cinase da glicólise (p. 554), que tem uma grande variação negativa da energia livre e é, portanto, irreversível em condições que prevalecem nas células intactas (Tabela 14-2, etapa ❿). Assim, a fosforilação do piruvato é alcançada por uma sequência de reações de desvio que, em eucariotos, requer enzimas existentes tanto no citosol como nas mitocôndrias. Como será visto, a via representada na Figura 14-17 e descrita em detalhes aqui é uma das duas rotas que levam de piruvato a PEP; essa é a via predominante quando piruvato e alanina são os precursores glicogênicos. Uma segunda via, descrita posteriormente, predomina quando o lactato é o precursor glicogênico.

O piruvato é primeiro transportado do citosol para a mitocôndria ou é gerado dentro da mitocôndria a partir da transaminação da alanina; nessa reação, o grupamento $\alpha$-amino é transferido da alanina (gerando piruvato) para um $\alpha$-cetoácido carboxílico (reações de transaminação são discutidas em detalhe no Capítulo 18). A seguir, a **piruvato-carboxilase**, uma enzima mitocondrial que requer a coenzima **biotina**, converte o piruvato a oxaloacetato (**Figura 14-18**):

$$\text{Piruvato} + HCO_3^- + \text{ATP} \longrightarrow \text{Oxaloacetato} + \text{ADP} + P_i \quad (14\text{-}4)$$

A reação de carboxilação envolve biotina como transportador de bicarbonato ativado, como representado na **Figura 14-19**; o mecanismo de reação está esquematizado na Figura 16-17. (Note que $HCO_3^-$ é formado pela ionização do ácido carbônico formado a partir de $CO_2 + H_2O$.) $HCO_3^-$ é fosforilado por ATP para formar um anidrido híbrido (carboxifosfato); a seguir a biotina desloca o fosfato na formação de carboxibiotina.

A piruvato-carboxilase é a primeira enzima de regulação na via gliconeogênica, necessitando de acetil-CoA como efetor positivo. (Acetil-CoA é produzida pela oxidação de ácidos graxos [Capítulo 17], e seu acúmulo sinaliza a disponibilidade de ácidos graxos como combustíveis.) Como será visto no Capítulo 16 (ver Figura 16-16), a reação da piruvato-carboxilase pode reconstituir intermediários de outra via metabólica central, o ciclo do ácido cítrico.

Como a membrana mitocondrial não tem transportador para o oxaloacetato, antes de ser exportado para o citosol o oxaloacetato formado a partir do piruvato deve ser redu-

**TABELA 14-2** Variação de energia livre das reações glicolíticas em eritrócitos

| | Etapa da reação glicolítica | $\Delta G'^\circ$ (kJ/mol) | $\Delta G$ (kJ/mol) |
|---|---|---|---|
| ❶ | Glicose + ATP ⟶ glicose-6-fosfato + ADP | −16,7 | −33,4 |
| ❷ | Glicose-6-fosfato ⇌ frutose-6-fosfato | 1,7 | 0 a 25 |
| ❸ | Frutose-6-fosfato + ATP ⟶ frutose-1,6-bifosfato + ADP | −14,2 | −22,2 |
| ❹ | Frutose-1,6-bifosfato ⇌ di-hidroxiacetona-fosfato + gliceraldeído-3-fosfato | 23,8 | −6 a 0 |
| ❺ | Di-hidroxiacetona-fosfato ⇌ gliceraldeído-3-fosfato | 7,5 | 0 a 4 |
| ❻ | Gliceraldeído-3-fosfato + $P_i$ + $NAD^+$ ⇌ 1,3-bifosfoglicerato + NADH + $H^+$ | 6,3 | −2 a 2 |
| ❼ | 1,3-Bifosfoglicerato + ADP ⇌ 3-fosfoglicerato + ATP | −18,8 | 0 a 2 |
| ❽ | 3-Fosfoglicerato ⇌ 2-fosfoglicerato | 4,4 | 0 a 0,8 |
| ❾ | 2-Fosfoglicerato ⇌ fosfoenolpiruvato + $H_2O$ | 7,5 | 0 a 3,3 |
| ❿ | Fosfoenolpiruvato + ADP ⟶ piruvato + ATP | −31,4 | −16,7 |

**Nota:** $\Delta G'^\circ$ é a variação de energia livre padrão, como definido no Capítulo 13 (p. 507-508). $\Delta G$ é a variação de energia livre calculada a partir das concentrações reais dos intermediários glicolíticos presentes em condições fisiológicas nos eritrócitos, em pH 7. As reações glicolíticas de contorno da gliconeogênese estão mostradas em vermelho. As equações bioquímicas não são necessariamente equilibradas para H ou carga (p. 517).

Bicarbonato Piruvato

ATP
Piruvato-carboxilase
Biotina
ADP + $P_i$
Oxaloacetato
**(a)**

Oxaloacetato
GTP
Guanosina
GDP
PEP-carboxicinase
$CO_2$
Fosfoenolpiruvato
**(b)**

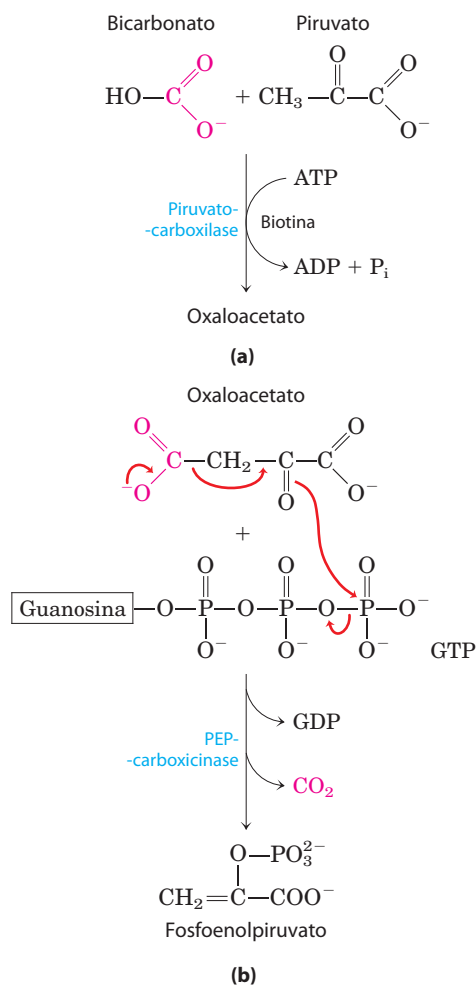
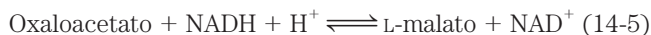



**FIGURA 14-18 Síntese de fosfoenolpiruvato a partir de piruvato. (a)** Na mitocôndria, o piruvato é convertido a oxaloacetato em uma reação dependente de biotina, catalisada pela piruvato-carboxilase. **(b)** No citosol, oxaloacetato é convertido a fosfoenolpiruvato pela PEP-carboxicinase. O $CO_2$ incorporado na reação da piruvato-carboxilase é perdido aqui como $CO_2$. A descarboxilação leva a um rearranjo de elétrons que facilita o ataque do oxigênio do carbonil da porção piruvato sobre o fosfato $\gamma$ do GTP.

zido a malato pela **malato-desidrogenase** mitocondrial, com o consumo de NADH:

$$\text{Oxaloacetato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{L-malato} + \text{NAD}^+ \quad (14\text{-}5)$$

A variação de energia livre padrão para esta reação é muito alta, mas em condições fisiológicas (inclusive uma concentração muito baixa de oxaloacetato) o $\Delta G \approx 0$ e a reação é prontamente reversível. A malato-desidrogenase mitocondrial age tanto na gliconeogênese como no ciclo do ácido cítrico, mas o fluxo global dos metabólitos nos dois processos ocorre em sentidos opostos.

O malato deixa a mitocôndria por meio de um transportador específico presente na membrana mitocondrial interna (ver Figura 19-31), e no citosol ele é reoxidado a oxaloacetato, com a produção de NADH citosólico:

$$\text{Malato} + \text{NAD}^+ \longrightarrow \text{oxaloacetato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \quad (14\text{-}6)$$

O oxaloacetato é então convertido a PEP pela **fosfoenolpiruvato-carboxicinase** (Figura 14-18). Esta reação é dependente de $Mg^{2+}$ e requer GTP como doador de grupo fosforil:

$$\text{Oxaloacetato} + \text{GTP} \rightleftharpoons \text{PEP} + \text{CO}_2 + \text{GDP} \quad (14\text{-}7)$$

A reação é reversível em condições intracelulares; a formação de um composto de fosfato de alta energia (PEP) é balanceada pela hidrólise de outro composto (GTP).

O braço biotinil-Lys longo desloca o $CO_2$ do sítio 1 para o sítio 2.
$HCO_3^-$
ATP ADP $P_i$
Sítio 1
Sítio 2
Lys
Piruvato-carboxilase
Piruvato
$CO_2$
Oxaloacetato

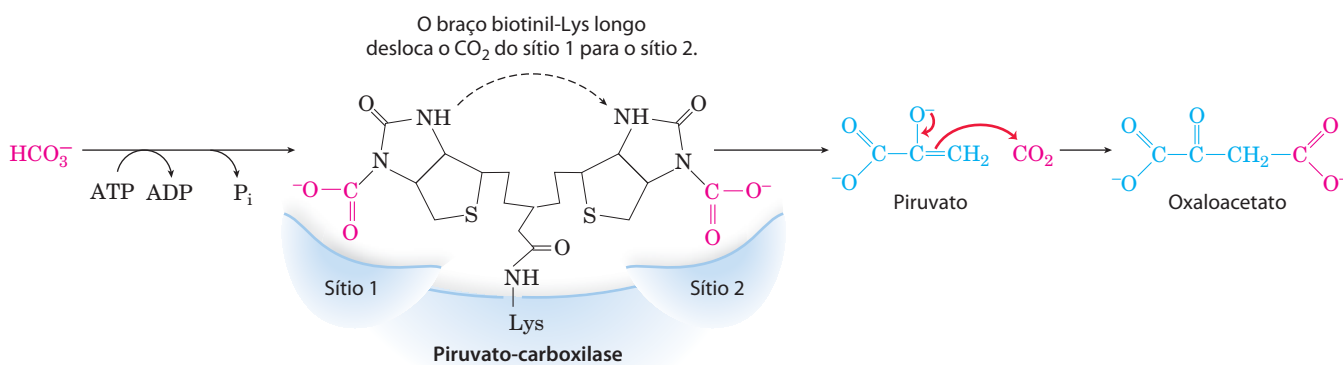
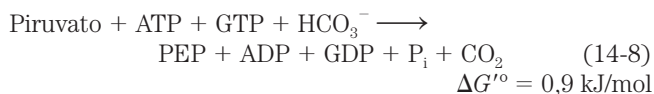



**FIGURA 14-19 Papel da biotina na reação da piruvato-carboxilase.** O cofator está covalentemente ligado à enzima por uma ligação amida com o grupo $\varepsilon$-amino de um resíduo de Lys, formando uma biotinil-enzima. A reação ocorre em duas fases, em dois sítios diferentes da enzima. No sítio catalítico 1, o íon bicarbonato é convertido a $CO_2$ com gasto de ATP. Em seguida, o $CO_2$ reage com a biotina, formando carboxibiotinil-enzima. O braço longo composto pela biotina e a cadeia lateral da Lys transporta o $CO_2$ da carboxibiotinil-enzima para o sítio catalítico 2 na superfície da enzima, onde o $CO_2$ é liberado e reage com o piruvato, formando oxaloacetato e regenerando o complexo biotinil-enzima. A função geral dos braços flexíveis no transporte de intermediários de reação entre sítios ativos de enzimas está descrita na Figura 16-18, e os detalhes do mecanismo da reação da piruvato-carboxilase estão mostrados na Figura 16-17. Mecanismos semelhantes ocorrem em outras reações de carboxilação dependentes de biotina, como as catalisadas pela propionil-CoA-carboxilase (ver Figura 17-12) e acetil-CoA-carboxilase (ver Figura 21-1).

A equação global para esse conjunto de reações de contorno é a soma das Equações 14-4 até 14-7:

$$\text{Piruvato} + \text{ATP} + \text{GTP} + HCO_3^- \longrightarrow \text{PEP} + \text{ADP} + \text{GDP} + P_i + CO_2 \quad (14\text{-}8)$$
$$\Delta G'^{\circ} = 0{,}9 \text{ kJ/mol}$$

Dois grupos fosfato de alta energia (um do ATP e um do GTP), cada um rendendo em torno de 50 kJ/mol em condições celulares, devem ser gastos para fosforilar uma molécula de piruvato a PEP. Ao contrário, quando PEP é convertido a piruvato durante a glicólise, apenas um ATP é gerado a partir de ADP. Embora a variação da energia livre padrão ($\Delta G'^{\circ}$) da via de duas etapas da conversão de piruvato em PEP seja de 0,9 kJ/mol, a variação de energia livre real ($\Delta G$), calculada a partir das medidas das concentrações celulares dos intermediários, é altamente negativa (−25 kJ/mol); isso é consequência do consumo rápido de PEP em outras reações, de modo que sua concentração permanece relativamente baixa. A reação é assim efetivamente irreversível na célula.

Observe que o $CO_2$ adicionado ao piruvato na etapa catalisada pela piruvato-carboxilase é a mesma molécula perdida na reação da PEP-carboxicinase (Figura 14-18b). Essa sequência de carboxilação-descarboxilação representa uma forma de "ativação" do piruvato, em que a descarboxilação do oxaloacetato facilita a formação de PEP. No Capítulo 21 será visto como uma sequência similar de carboxilação-descarboxilação é usada para ativar acetil-CoA para a síntese de ácidos graxos (ver Figura 21-1).

Existe uma lógica na rota dessas reações na mitocôndria. A relação [NADH]/[$NAD^+$] no citosol é $8 \times 10^{-4}$, cerca de $10^5$ vezes menor do que na mitocôndria. Como o NADH citosólico é consumido na gliconeogênese (na conversão de 1,3-bifosfoglicerato em gliceraldeído-3-fosfato; Figura 14-17), a biossíntese de glicose não pode ocorrer a menos que o NADH esteja disponível. O transporte de malato da mitocôndria ao citosol e a sua conversão a oxaloacetato transfere efetivamente equivalentes redutores para o citosol, onde eles são escassos. Consequentemente, essa transformação de piruvato em PEP proporciona um importante equilíbrio entre NADH produzido e consumido no citosol durante a gliconeogênese.

Um segundo contorno piruvato → PEP predomina quando o lactato é o precursor glicogênico (**Figura 14-20**). Essa via faz uso do lactato produzido pela glicólise nos eritrócitos ou no músculo em anaerobiose, por exemplo, sendo particularmente importante em vertebrados após exercício vigoroso (Quadro 14-2). A conversão de lactato em piruvato no citosol de hepatócitos gera NADH, e a exportação de equivalentes redutores (como malato) da mitocôndria é consequentemente desnecessária. Depois que o piruvato produzido na reação da lactato-desidrogenase é transportado para a mitocôndria, ele é convertido a oxaloacetato pela piruvato-carboxilase, como descrito antes. Esse oxaloacetato, no entanto, é convertido diretamente a PEP pela isoenzima mitocondrial da PEP-carboxicinase, e o PEP é transportado para fora da mitocôndria para dar continuidade à via gliconeogênica. As isoenzimas mitocondriais e citosólicas da PEP-carboxicinase são codificadas por genes separados nos cromossomos nucleares, proporcionando outro exemplo de duas enzimas distintas catalisando a mesma reação, mas em localizações celulares ou com papéis metabólicos diferentes (lembre-se das isoenzimas da hexocinase).

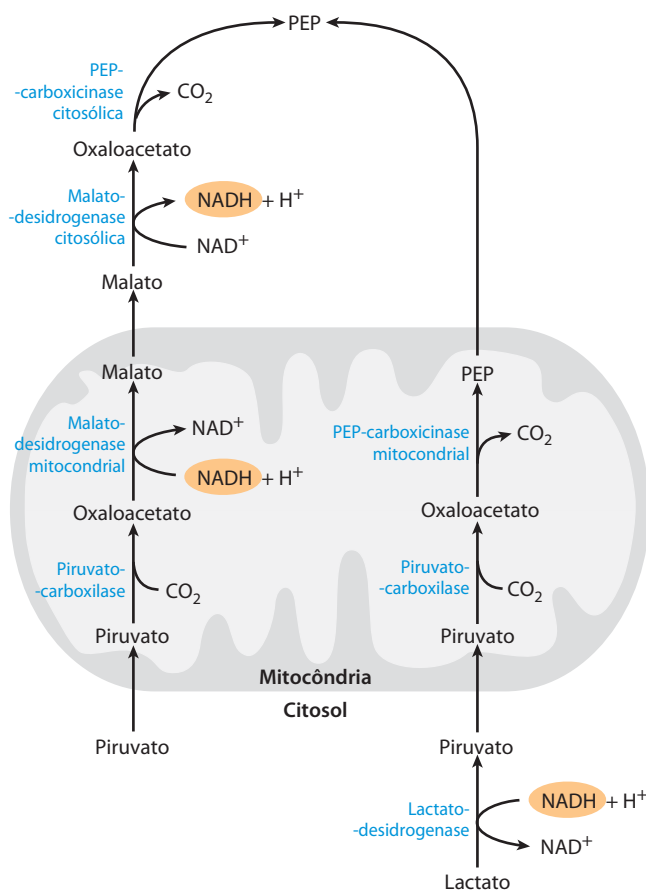
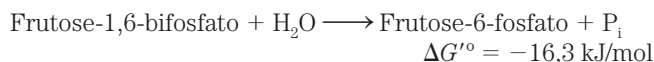



**FIGURA 14-20 Vias alternativas da transformação do piruvato em fosfoenolpiruvato.** A importância relativa das duas vias depende da disponibilidade de lactato ou piruvato e das necessidades citosólicas de NADH para gliconeogênese. A via à direita predomina quando o lactato é o precursor, já que NADH citosólico é gerado na reação da lactato-desidrogenase e não pode ser transportado para fora da mitocôndria (ver texto). A necessidade de ATP para a piruvato-carboxilase e GTP para PEP-carboxicinase (ver Figura 14-17) está omitida para simplificação.

## A conversão de frutose-1,6-bifostato a frutose-6-fosfato é o segundo contorno

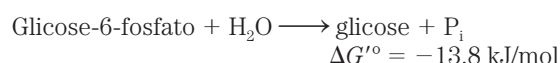
A segunda reação glicolítica que não pode participar da gliconeogênese é a fosforilação da frutose-6-fosfato pela PFK-1 (Tabela 14-2, etapa ❸). Como essa reação é altamente exergônica e por isso irreversível em células intactas, a geração de frutose-6-fosfato a partir de frutose-1,6-bifosfato (Figura 14-17) é catalisada por uma enzima diferente, dependente de $Mg^{2+}$, a **frutose-1,6-bifosfatase** (**FBPase-1**), que promove a *hidrólise* essencialmente irreversível

do fostato em C-1 (*não* a transferência do grupo fosforil para o ADP):

$$\text{Frutose-1,6-bifosfato} + H_2O \longrightarrow \text{Frutose-6-fosfato} + P_i \quad \Delta G'^{\circ} = -16{,}3 \text{ kJ/mol}$$

A FBPase-1 é assim chamada para distingui-la de outra enzima similar (FBPase-2) com função de regulação, discutida no Capítulo 15.

## A conversão de glicose-6-fosfato em glicose é o terceiro contorno

O terceiro contorno é a reação final da gliconeogênese, a desfosforilação da glicose-6-fosfato para formar glicose (Figura 14-17). O inverso da reação da hexocinase (p. 548) exigiria a transferência de um grupo fosforil da glicose-6--fosfato para ADP, formando ATP, reação energeticamente desfavorável (Tabela 14-2, etapa ❶). A reação catalisada pela **glicose-6-fosfatase** não requer a síntese de ATP, sendo a hidrólise simples de uma ligação éster fosfato:

$$\text{Glicose-6-fosfato} + H_2O \longrightarrow \text{glicose} + P_i \quad \Delta G'^{\circ} = -13{,}8 \text{ kJ/mol}$$

Essa enzima ativada por $Mg^{2+}$ é encontrada no lúmen do retículo endoplasmático de hepatócitos, de células renais e das células epiteliais do intestino delgado (ver Figura 15-30), mas não é encontrada em outros tecidos, que são, portanto, incapazes de fornecer glicose para o sangue. Se outros tecidos tivessem a glicose-6-fosfatase, essa atividade enzimática hidrolisaria a glicose-6-fosfato necessária para a glicólise nesses tecidos. A glicose produzida pela gliconeogênese no fígado, nos rins ou ingerida na dieta é entregue a esses outros tecidos, inclusive o cérebro e os músculos, pela corrente sanguínea.

## A gliconeogênese é energeticamente dispendiosa, mas essencial

A soma das reações biossintéticas que levam de piruvato até glicose livre no sangue (Tabela 14-3) é

$$2 \text{ Piruvato} + 4ATP + 2NADH + 2H^+ + 4H_2O \longrightarrow \text{glicose} + 4ADP + 2GDP + 6P_i + 2NAD^+ \quad (14\text{-}9)$$

Para cada molécula de glicose formada a partir do piruvato, seis grupos fosfato de alta energia são consumidos, quatro na forma de ATP e dois na forma de GTP. Além disso, duas moléculas de NADH são necessárias para a redução de duas moléculas de 1,3-bifosfoglicerato. Evidentemente, a Equação 14-9 não é simplesmente o inverso da equação para a conversão de glicose em piruvato pela glicólise, que exigiria apenas duas moléculas de ATP:

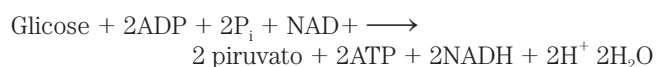
$$\text{Glicose} + 2ADP + 2P_i + NAD+ \longrightarrow 2 \text{ piruvato} + 2ATP + 2NADH + 2H^+ \; 2H_2O$$

A síntese de glicose a partir de piruvato é um processo relativamente dispendioso. A maior parte desse alto custo energético é necessária para assegurar a irreversibilidade da gliconeogênese. Em condições intracelulares, a variação de energia livre padrão da glicólise é pelo menos −63 kJ/mol. Nas mesmas condições o $\Delta G$ global da gliconeogênese é −16 kJ/mol. Logo, tanto a glicólise como a gliconeogênese são processos essencialmente irreversíveis nas células. Uma segunda vantagem em investir energia para converter piruvato em glicose é que se o piruvato fosse excretado, seu considerável potencial para formação de ATP pela completa oxidação aeróbia seria perdido (mais de 10 ATP são formados por piruvato, como será visto no Capítulo 16).

**TABELA 14-3** Reações sequenciais na gliconeogênese a partir do piruvato

| Reação | |
|---|---|
| Piruvato + $HCO_3^-$ + ATP ⟶ oxaloacetato + ADP + $P_i$ | ×2 |
| Oxaloacetato + GTP ⇌ fosfoenolpiruvato + $CO_2$ + GDP | ×2 |
| Fosfoenolpiruvato + $H_2O$ ⇌ 2-fosfoglicerato | ×2 |
| 2-Fosfoglicerato ⇌ 3-fosfoglicerato | ×2 |
| 3-Fosfoglicerato + ATP ⇌ 1,3-bifosfoglicerato + ADP | ×2 |
| 1,3-Bifosfoglicerato + NADH + $H^+$ ⇌ gliceraldeído-3-fosfato + $NAD^+$ + $P_i$ | ×2 |
| Gliceraldeído-3-fosfato ⇌ di-hidroxiacetona-fosfato | |
| Gliceraldeído-3-fosfato + di-hidroxiacetona-fosfato ⇌ frutose-1,6-bifosfato | |
| Frutose-1,6-bifosfato ⟶ frutose-6-fosfato + $P_i$ | |
| Frutose-6-fosfato ⇌ glicose-6-fosfato | |
| Glicose-6-fosfato + $H_2O$ ⟶ glicose + $P_i$ | |
| *Soma*: 2 Piruvato + 4ATP + 2GTP + 2NADH + $2H^+$ + $4H_2O$ ⟶ glicose + 4ADP + 2GDP + $6P_i$ + $2NAD^+$ | |

**Nota:** As reações de contorno estão em vermelho; todas as outras reações são etapas reversíveis da glicólise. Os números à direita indicam que a reação é para ser contada duas vezes, já que dois precursores de três carbonos são necessários para fazer uma molécula de glicose. As reações necessárias para substituir o NADH citosólico consumido na reação da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (a conversão de lactato a piruvato no citosol ou o transporte de equivalentes redutores da mitocôndria para o citosol na forma de malato) não estão consideradas neste resumo. As equações bioquímicas não estão necessariamente equilibradas para H e carga elétrica (p. 517).

## Os intermediários do ciclo do ácido cítrico e alguns aminoácidos são glicogênicos

A via biossintética para a formação de glicose descrita anteriormente permite a síntese líquida de glicose não apenas a partir de piruvato, mas também dos intermediários do ciclo do ácido cítrico com quatro, cinco e seis carbonos (Capítulo 16). Citrato, isocitrato, $\alpha$-cetoglutarato, succinil-CoA, succinato, fumarato e malato – todos são intermediários do ciclo do ácido cítrico que podem sofrer oxidação a oxaloacetato (ver Figura 16-7). Alguns ou todos os átomos de carbono da maior parte dos aminoácidos derivados das proteínas são basicamente catabolizados a piruvato ou em intermediários do ciclo do ácido cítrico. Tais aminoácidos podem, portanto, ser convertidos a glicose e são chamados de **glicogênicos** (Tabela 14-4). A alanina e a glutamina, as principais moléculas que transportam grupos amino de tecidos extra-hepáticos até o fígado (ver Figura 18-9), são aminoácidos glicogênicos particularmente importantes em mamíferos. Após a retirada de seus grupos amino da mitocôndria dos hepatócitos, os esqueletos de carbono remanescentes (piruvato e $\alpha$-cetoglutarato, respectivamente) são prontamente canalizados para a gliconeogênese.

## Os mamíferos não podem converter ácidos graxos em glicose

Nos mamíferos não ocorre a conversão líquida de ácidos graxos em glicose. Como será visto no Capítulo 17, o catabolismo da maior parte dos ácidos graxos gera apenas acetil-CoA. Os mamíferos não podem usar a acetil-CoA como um precursor de glicose, já que a reação da piruvato-desidrogenase é irreversível e as células não possuem outra via para converter acetil-CoA em piruvato. Os vegetais, as leveduras e muitas bactérias possuem uma via (o ciclo do glioxilato; ver Figura 16-22) para converter acetil-CoA em oxaloacetato, portanto esses organismos podem utilizar ácidos graxos como matéria-prima para a gliconeogênese. Isso é importante durante a germinação das sementes; por exemplo, antes de o desenvolvimento das folhas e a fotossíntese fornecerem energia e carboidratos, as plântulas contam com os estoques de óleo das sementes para a produção de energia e para a biossíntese da parede celular.

Apesar de os mamíferos não converterem ácidos graxos em carboidrato, eles podem usar a pequena quantidade de glicerol produzido na quebra das gorduras (*triacilgliceróis*) para a gliconeogênese. A fosforilação do glicerol pela glicerol-cinase, seguida pela oxidação do carbono central, gera di-hidroxiacetona-fosfato, intermediário da gliconeogênese no fígado.

Como será visto no Capítulo 21, o glicerol-fosfato é um intermediário essencial na síntese de triacilgliceróis nos adipócitos, mas essas células carecem da glicerol-cinase e, portanto, não podem simplesmente fosforilar o glicerol. Em vez disso, os adipócitos realizam uma versão truncada da gliconeogênese, conhecida como **gliceroneogênese**: a conversão de piruvato em di-hidroxiacetona-fosfato pelas reações iniciais da gliconeogênese, seguida pela redução da di-hidroxiacetona-fosfato em glicerol-fosfato (ver Figura 21-21).

**TABELA 14-4** Aminoácidos glicogênicos, agrupados conforme o local de entrada

| Piruvato | Succinil-CoA |
|---|---|
| Alanina | Isoleucina* |
| Cisteína | Metionina |
| Glicina | Treonina |
| Serina | Valina |
| Treonina | **Fumarato** |
| Triptofano* | Fenilalanina* |
| **$\alpha$-Cetoglutarato** | Tirosina* |
| Arginina | **Oxaloacetato** |
| Glutamato | Asparagina |
| Glutamina | Aspartato |
| Histidina | |
| Prolina | |

**Nota**: Todos esses aminoácidos são precursores da glicose sanguínea ou do glicogênio hepático, já que eles podem ser convertidos a piruvato ou intermediários do ciclo do ácido cítrico. Dos 20 aminoácidos comuns, apenas a leucina e a lisina são incapazes de fornecer carbonos para a síntese líquida de glicose.
*Esses aminoácidos também são cetogênicos (ver Figura 18-15).

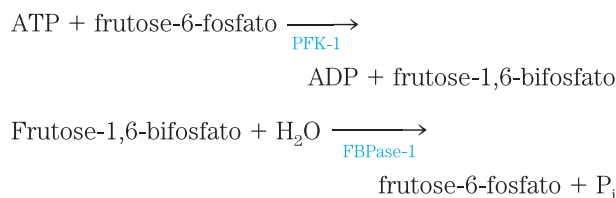
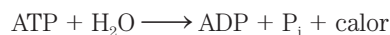
## A glicólise e a gliconeogênese são mutuamente reguladas

Se a glicólise (a conversão de glicose em piruvato) e a gliconeogênese (a conversão de piruvato em glicose) ocorressem simultaneamente em altas taxas, o resultado seria o consumo de ATP e a produção de calor. Por exemplo, PFK-1 e FBPase-1 catalisam reações opostas:

$$\text{ATP} + \text{frutose-6-fosfato} \xrightarrow[\text{PFK-1}]{} \text{ADP} + \text{frutose-1,6-bifosfato}$$

$$\text{Frutose-1,6-bifosfato} + H_2O \xrightarrow[\text{FBPase-1}]{} \text{frutose-6-fosfato} + P_i$$

A soma dessas duas reações é

$$\text{ATP} + H_2O \longrightarrow \text{ADP} + P_i + \text{calor}$$

Essas duas reações enzimáticas, e várias outras nas duas vias, são reguladas alostericamente e por modificações covalentes (fosforilação). No Capítulo 15 serão vistos os mecanismos desta regulação em detalhe. Por ora, basta dizer que as vias são reguladas de forma que, quando o fluxo de glicose por meio da glicólise aumenta, o fluxo de piruvato em direção à glicose diminui, e vice-versa.

### RESUMO 14.4 Gliconeogênese

- A gliconeogênese é um processo ubíquo e de múltiplas etapas em que a glicose é produzida a partir de lactato, piruvato ou oxaloacetato, ou qualquer composto (incluindo os intermediários do ciclo do ácido cítrico) que possa ser convertido a um desses intermediários. Sete etapas da gliconeogênese são catalisadas pelas

mesmas enzimas usadas na glicólise; essas são as reações reversíveis.

- Três etapas irreversíveis na glicólise são contornadas por reações catalisadas pelas enzimas gliconeogênicas: (1) a conversão de piruvato em PEP via oxaloacetato, catalisada pela piruvato-carboxilase e pela PEP-carboxicinase; (2) a desfosforilação da frutose-1,6-bifosfato pela FBPase-1; e (3) a desfosforilação da glicose-6-fosfato pela glicose-6-fosfatase.
- A formação de uma molécula de glicose a partir de piruvato requer 4 ATP, 2 GTP e 2NADH, o que é dispendioso.
- Em mamíferos, a gliconeogênese no fígado, nos rins e no intestino delgado gera glicose para uso pelo cérebro, músculos e eritrócitos.
- A piruvato-carboxilase é estimulada por acetil-CoA, aumentando a taxa da gliconeogênese quando as células dispõem do fornecimento adequado de outros substratos (ácidos graxos) para a produção de energia.
- Os animais não conseguem converter acetil-CoA, derivado dos ácidos graxos, em glicose; vegetais e microrganismos, sim.
- A glicólise e a gliconeogênese são mutuamente reguladas para prevenir o gasto operacional com as duas vias ao mesmo tempo.

## 14.5 Oxidação da glicose pela via das pentoses-fosfato

Na maioria dos tecidos animais, o principal destino catabólico da glicose-6-fosfato é a degradação glicolítica até piruvato, cuja maior parte é então oxidada pelo ciclo do ácido cítrico, levando enfim à formação de ATP. No entanto, a glicose-6-fosfato tem outros destinos catabólicos, que levam a produtos especializados, necessários para a célula. De grande importância em alguns tecidos é a oxidação da glicose-6-fosfato até pentoses-fosfato pela **via das pentoses-fosfato** (também chamada de **via do fosfogliconato** ou **via da hexose-monofosfato**; **Figura 14-21**). Nessa via de oxidação, $NADP^+$ é o aceptor de elétrons, gerando NADPH. As células que se dividem rapidamente, como aquelas da medula óssea, da pele e da mucosa intestinal, assim como aquelas de tumores, utilizam a pentose ribose-5-fosfato para fazer RNA, DNA e coenzimas como ATP, NADH, $FADH_2$ e coenzima A.

Em outros tecidos, o produto essencial da via das pentoses-fosfato não é pentose, mas o doador de elétrons NADPH, necessário para as reduções biossintéticas ou para contrapor os efeitos deletérios dos radicais de oxigênio. Os tecidos em que ocorre a síntese de grande quantidade de ácidos graxos (fígado, tecido adiposo, glândulas mamárias durante a lactação) ou a síntese muito ativa de colesterol e hormônios esteroides (fígado, glândulas suprarrenais e gônadas) utilizam o NADPH produzido por essa via. Os eritrócitos e as células da córnea e do cristalino estão diretamente expostos ao oxigênio e, por isso, aos efeitos danosos dos radicais livres gerados pelo oxigênio. Por manter

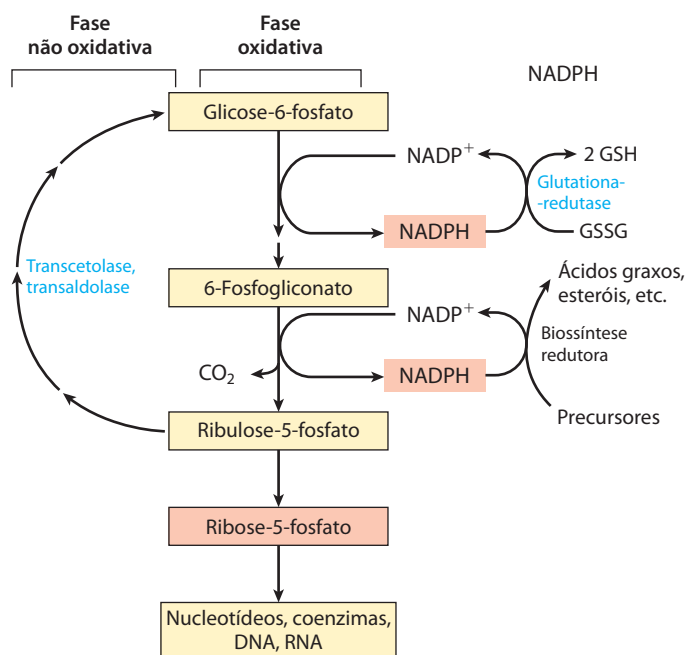



**FIGURA 14-21 Esquema geral da via das pentoses-fosfato.** O NADH formado na fase oxidativa é utilizado para produzir glutationa, GSSG (ver Quadro 14-4) e dar suporte para a biossíntese redutora. O outro produto da fase oxidativa é a ribose-5-fosfato, que serve como precursor para nucleotídeos, coenzimas e ácidos nucleicos. Em células que não estão utilizando a ribose-5-fosfato para a biossíntese, a fase não oxidativa regenera seis moléculas da pentose em cinco moléculas da hexose glicose-6-fosfato, permitindo a produção contínua de NADPH e convertendo glicose-6-fosfato (em seis ciclos) a $CO_2$.

um ambiente redutor (uma relação alta de NADPH para $NADP^+$ assim como da forma reduzida para a forma oxidada da glutationa), essas células podem impedir ou recuperar o dano oxidativo de proteínas, lipídeos e outras moléculas sensíveis. Nos eritrócitos, o NADPH produzido pela via das pentoses-fosfato é tão importante em impedir o dano oxidativo que um defeito genético na glicose-6-fosfato-desidrogenase, a primeira enzima da via, pode causar, levando a sérias consequências médicas (Quadro 14-4). ■

### A fase oxidativa produz pentoses-fosfato e NADPH

A primeira reação da via das pentoses-fosfato (**Figura 14-22**) é a oxidação da glicose-6-fosfato pela **glicose-6-fosfato-desidrogenase** (**G6PD**) para formar 6-fosfoglicona-$\delta$-lactona, um éster intramolecular. $NADP^+$ é o aceptor de elétrons, e o equilíbrio global está muito deslocado no sentido da formação de NADPH. A lactona é hidrolisada ao ácido livre 6-fosfogliconato por uma **lactonase** específica, que sofre oxidação e descarboxilação pela **6-fosfogliconato-desidrogenase** para formar a cetopentose ribulose-5-fosfato; a reação gera uma segunda molécula de NADPH. (Essa ribulose-5-fosfato é importante na regulação da glicólise e da gliconeogênese, como será visto no Capítulo 15.) A **fosfopentose-isomerase** converte a ribulose-5-fosfato ao seu isômero aldose, ribose-5-fosfato. Em alguns tecidos,

## QUADRO 14-4  MEDICINA Por que Pitágoras não comia falafel: deficiência da glicose-6-fosfato-desidrogenase

O feijão-fava, ingrediente do falafel, tem sido uma importante fonte de alimento no Mediterrâneo e no Oriente Médio desde a Antiguidade. O filósofo e matemático grego Pitágoras proibia seus seguidores de alimentar-se de fava, talvez porque ela deixasse muitas pessoas doentes com uma condição chamada de favismo, que pode ser fatal. No favismo, os eritrócitos começam a sofrer lise 24 a 48 horas após a ingestão dos feijões, liberando hemoglobina livre no sangue, podendo resultar em icterícia e algumas vezes em falência renal. Sintomas similares podem ocorrer com a ingestão do fármaco contra a malária, primaquina, ou antibióticos de sulfa, ou após a exposição a certos herbicidas. Esses sintomas têm uma base genética: a deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD), que afeta em torno de 400 milhões de pessoas em todo o mundo. A maioria dos indivíduos deficientes em G6PD é assintomática. Apenas a combinação da deficiência de G6PD e certos fatores ambientais produz as manifestações clínicas.

A glicose-6-fosfato-desidrogenase catalisa a primeira etapa da via das pentoses-fosfato (ver Figura 14-22), que produz NADPH. Esse agente redutor, essencial em muitas vias biossintéticas, também protege as células do dano oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$) e pelos radicais livres superóxido, agentes oxidantes altamente reativos gerados como subprodutos metabólicos e pela ação de fármacos como a primaquina e produtos naturais como a divicina – o ingrediente tóxico do feijão-fava. Durante a destoxificação normal, $H_2O_2$ é convertido a $H_2O$ pela glutationa reduzida sob a ação da glutationa-peroxidase, e a glutationa oxidada é convertida de volta à forma reduzida por glutationa-redutase e NADPH (Figura Q-1). O $H_2O_2$ também é degradado a $H_2O$ e $O_2$ pela catalase, que também requer NADPH. Em indivíduos deficientes em G6PD, a produção de NADPH está diminuída e a destoxificação do $H_2O_2$ está inibida. Os danos celulares resultantes são peroxidação de lipídeos levando à degradação das membranas dos eritrócitos e oxidação de proteínas e do DNA.

A distribuição geográfica da deficiência de G6PD é instrutiva. Frequências tão altas quanto 25% ocorrem na África tropical, em partes do Oriente Médio e sul da Ásia, áreas onde a malária é mais prevalente. Além de tais observações epidemiológicas, estudos mostram que o crescimento do parasita causador da malária, *Plasmodium falciparum*, é inibido em eritrócitos deficientes em G6PD. O parasita é muito sensível ao dano oxidativo e morre por um nível de estresse oxidativo tolerável ao hospedeiro humano deficiente em G6PD. Já que a vantagem da resistência à malária equilibra a desvantagem da baixa resistência ao dano oxidativo, a seleção natural mantém o genótipo deficiente em G6PD em populações humanas onde a malária é prevalente. Apenas em condições insuportáveis de estresse oxidativo, causado por fármacos, herbicidas ou divicina, a deficiência de G6PD causa problemas médicos graves.

Supõe-se que um fármaco antimalária, como a primaquina, atue causando estresse oxidativo ao parasita. É irônico que os fármacos contra a malária possam causar doenças em humanos pelo mesmo mecanismo bioquímico que leva à resistência à malária. A divicina também age como fármaco antimalária, e a ingestão de feijão-fava pode proteger contra a malária. Recusando-se a comer falafel, muitos pitagóricos com atividade normal da G6PD talvez, inconscientemente, tenham aumentado o risco de contrair malária.

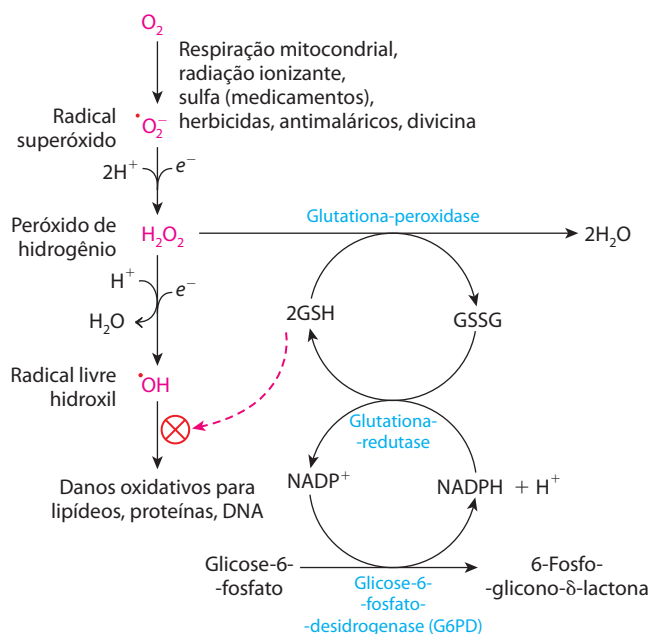
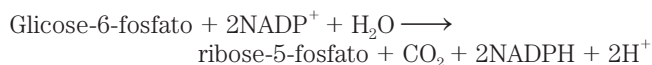



**FIGURA Q-1** Papel do NADPH e da glutationa na proteção das células contra derivados de oxigênio altamente reativos. A glutationa reduzida (GSH) protege a célula por destruir o peróxido de hidrogênio e os radicais livres hidroxil. A regeneração de GSH a partir de sua forma oxidada (GSSG) requer a produção de NADPH na reação da glicose-6-fosfato-desidrogenase.

a via das pentoses-fosfato termina nesse ponto, e a equação global é

$$\text{Glicose-6-fosfato} + 2NADP^+ + H_2O \longrightarrow \text{ribose-5-fosfato} + CO_2 + 2NADPH + 2H^+$$

O resultado líquido é a produção de NADPH, agente redutor para as reações biossintéticas, e ribose-5-fosfato, precursor para a síntese de nucleotídeos.

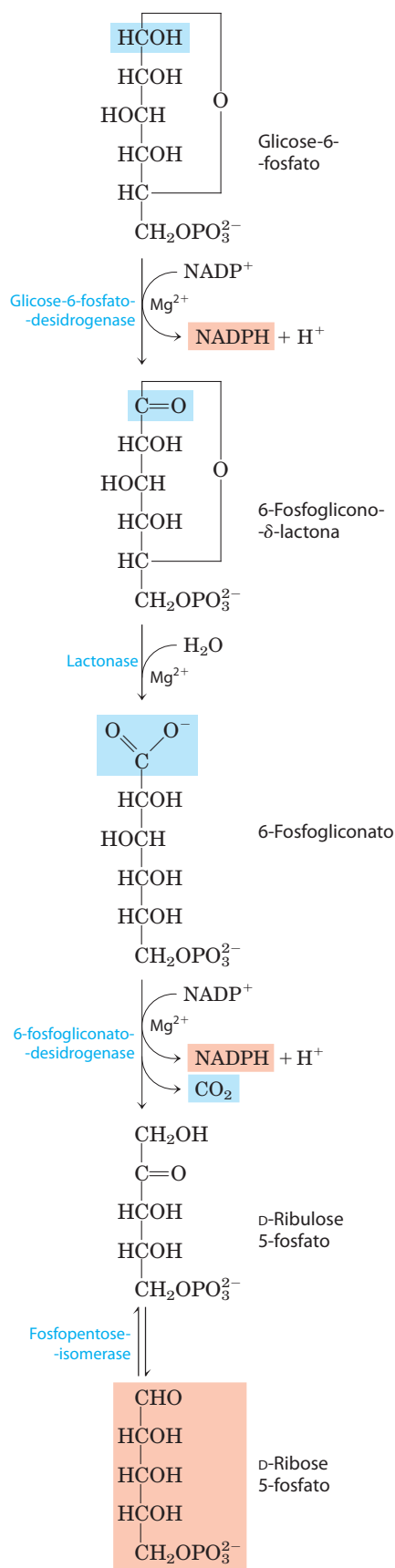
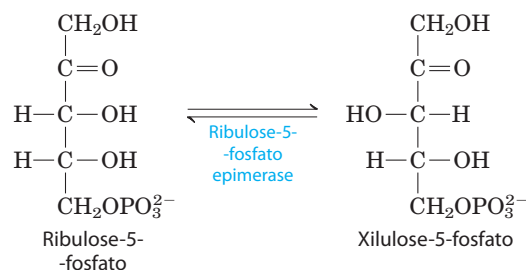



**FIGURA 14-22 Reações oxidativas da via das pentoses-fosfato.** Os produtos finais são ribose-5-fosfato, $CO_2$ e NADPH.

## A fase não oxidativa recicla as pentoses-fosfato a glicose-6-fosfato

Em tecidos que requerem principalmente NADPH, as pentoses-fosfato produzidas na fase oxidativa da via são recicladas em glicose-6-fosfato. Nessa fase não oxidativa, a ribulose-5-fosfato é primeiro epimerizada a xilulose-5--fosfato:

$$\begin{array}{c} CH_2OH \\ | \\ C{=}O \\ | \\ H{-}C{-}OH \\ | \\ H{-}C{-}OH \\ | \\ CH_2OPO_3^{2-} \end{array} \underset{\text{Ribulose-5-fosfato epimerase}}{\rightleftharpoons} \begin{array}{c} CH_2OH \\ | \\ C{=}O \\ | \\ HO{-}C{-}H \\ | \\ H{-}C{-}OH \\ | \\ CH_2OPO_3^{2-} \end{array}$$

Ribulose-5--fosfato → Xilulose-5-fosfato

A seguir, em uma série de rearranjos dos esqueletos de carbono (**Figura 14-23**), seis moléculas de açúcar-fosfato de cinco átomos de carbono são convertidas a cinco moléculas de açúcar-fosfato com seis átomos de carbono, completando o ciclo e permitindo a oxidação contínua de glicose-6-fosfato com a produção de NADPH. A reciclagem contínua leva finalmente à conversão de glicose-6-fosfato a seis $CO_2$. Duas enzimas exclusivas da via das pentoses--fosfato agem nessas interconversões de açúcares: a transcetolase e a transaldolase. A **transcetolase** catalisa a transferência de um fragmento de dois carbonos de uma cetose doadora a uma aldose aceptora (**Figura 14-24a**). Em sua primeira aparição na via das pentoses-fosfato, a transcetolase transfere C-1 e C-2 da xilulose-5-fosfato para a ribose-5-fosfato, formando o produto de sete carbonos sedoeptulose-7-fosfato (Figura 14-24b). O fragmento de três carbonos remanescente da xilulose é o gliceraldeído-3-fosfato.

Em seguida, a **transaldolase** catalisa uma reação semelhante à reação da aldolase na glicólise: um fragmento de três carbonos é removido da sedoeptulose-7-fosfato e condensado com o gliceraldeído-3-fosfato, formando frutose-6-fosfato e a tetrose eritrose-4-fosfato (**Figura 14-25**). Neste ponto, a transcetolase age novamente, formando frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato a partir de eritrose-4-fosfato e xilulose-5-fosfato (**Figura 14-26**). Duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato formadas por duas repetições dessas reações podem ser convertidas a uma molécula de frutose-1,6-bifosfato como na gliconeogênese (Figura 14-17), e finalmente a FBPase-1 e a fosfo-hexose-isomerase convertem frutose-1,6-bifosfato a glicose-6-fosfato. No total, seis pentoses-fosfato são convertidas a cinco hexoses-fosfato (Figura 14-23b) – agora o ciclo está completo!

A transcetolase requer o cofator tiamina-pirofosfato (TPP), que estabiliza um carbânion de dois carbonos nessa reação (**Figura 14-27a**), da mesma forma que o faz na reação da piruvato-descarboxilase (Figura 14-15). A transaldolase usa a cadeia lateral de uma Lys para formar a base de Schiff com o grupo carbonil de seu substrato, a cetose, dessa forma estabilizando o carbânion (Figura 14-27b) que é central para o mecanismo da reação.

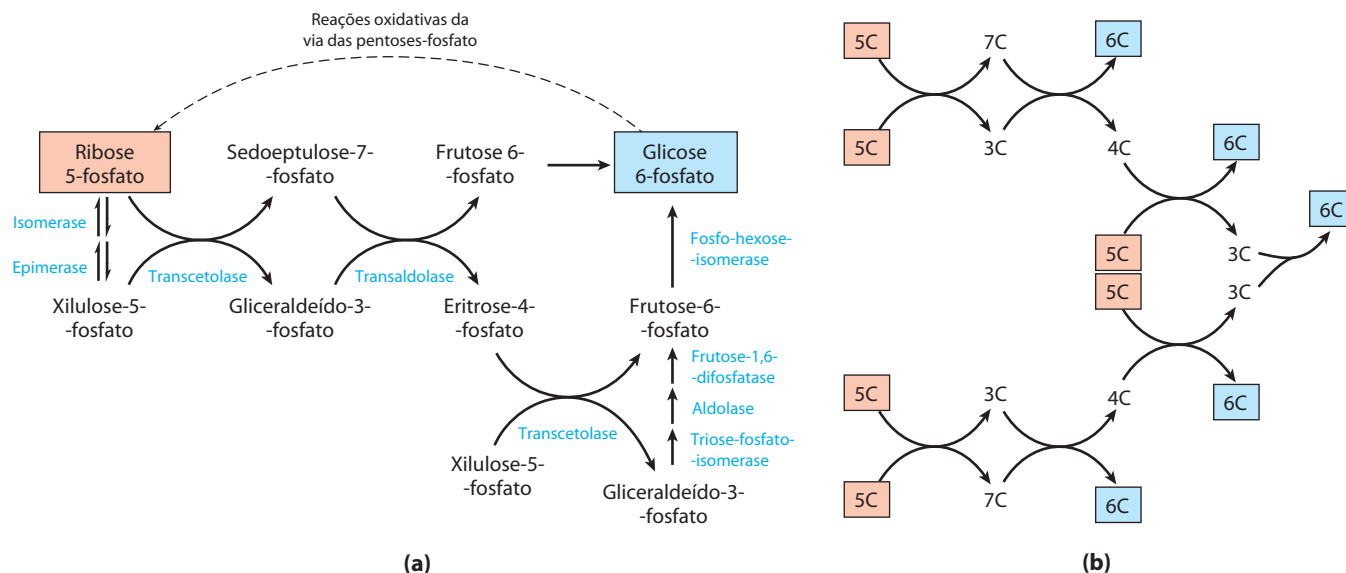



**FIGURA 14-23** **Reações não oxidativas da via das pentoses-fosfato.** **(a)** Essas reações convertem pentoses-fosfato a hexoses-fosfato, permitindo a continuação das reações de oxidação (ver Figura 14-22). A transcetolase e a transaldolase são específicas dessa via; as outras enzimas também participam das vias glicolítica e gliconeogênica. **(b)** Diagrama esquemático mostrando a via a partir de seis pentoses (6C) a cinco hexoses (5C). Note que isto envolve dois grupos de interconversões mostrados em (a). Todas as reações mostradas aqui são reversíveis; setas unidirecionais são usadas apenas para deixar claro o sentido das reações durante a oxidação contínua da glicose-6-fosfato. Nas reações independentes de luz da fotossíntese, o sentido dessas reações é invertido (ver Figura 20-10).

$CH_2OH$–C=O–CHOH–$R^1$ (Cetose doadora) + O=C(H)–$R^2$ (Aldose aceptora) $\underset{\text{Transcetolase}}{\overset{\text{TPP}}{\rightleftharpoons}}$ O=C(H)–$R^1$ + $CH_2OH$–C=O–CHOH–$R^2$

**(a)**

Xilulose-5-fosfato ($CH_2OH$–C=O–HO–C–H–H–C–OH–$CH_2OPO_3^{2-}$) + Ribose-5-fosfato (O=C(H)–H–C–OH–H–C–OH–H–C–OH–$CH_2OPO_3^{2-}$) $\underset{\text{Transcetolase}}{\overset{\text{TPP}}{\rightleftharpoons}}$ Gliceraldeído-3-fosfato (O=C(H)–H–C–OH–$CH_2OPO_3^{2-}$) + Sedoeptulose-7-fosfato ($CH_2OH$–C=O–HO–C–H–H–C–OH–H–C–OH–H–C–OH–$CH_2OPO_3^{2-}$)

**(b)**

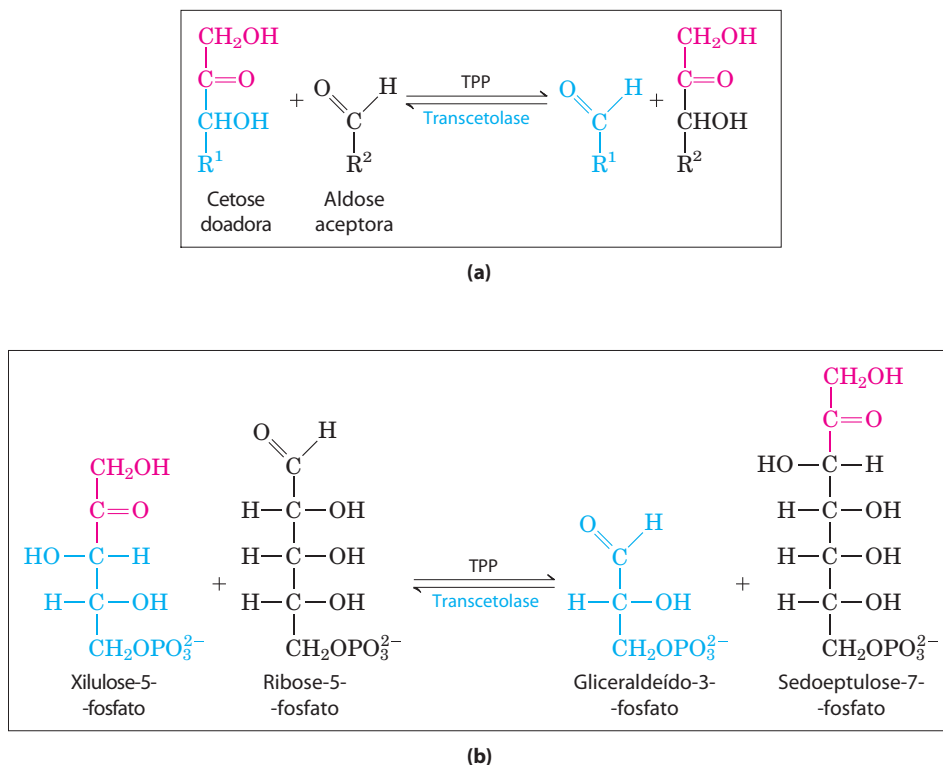



**FIGURA 14-24** **A primeira reação catalisada pela transcetolase.** **(a)** A reação geral catalisada pela transcetolase é a transferência de um grupo de dois carbonos, transportado temporariamente pela TPP ligada à enzima, de uma cetose doadora para uma aldose aceptora. **(b)** Conversão de duas pentoses--fosfato em uma triose-fosfato e um açúcar-fosfato de sete carbonos, sedoeptulose-7-fosfato.

$CH_2OH$ / C=O / HO—C—H / H—C—OH / H—C—OH / H—C—OH / $CH_2OPO_3^{2-}$ + O=C(H) / H—C—OH / $CH_2OPO_3^{2-}$ ⇌ (Transaldolase) O=C(H) / H—C—OH / H—C—OH / $CH_2OPO_3^{2-}$ + $CH_2OH$ / C=O / HO—C—H / H—C—OH / H—C—OH / $CH_2OPO_3^{2-}$

Sedoeptulose-7--fosfato | Gliceraldeído-3--fosfato | Eritrose-4--fosfato | Frutose-6--fosfato

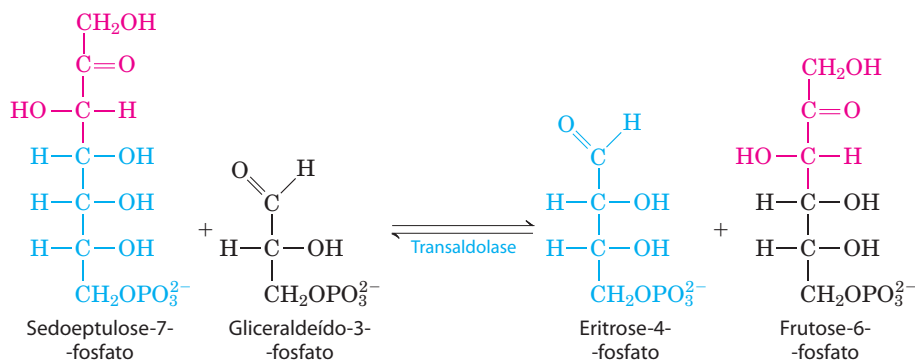



**FIGURA 14-25 A reação catalisada pela transaldolase.**

$CH_2OH$ / C=O / HO—C—H / H—C—OH / $CH_2OPO_3^{2-}$ + O=C(H) / H—C—OH / H—C—OH / $CH_2OPO_3^{2-}$ ⇌ (TPP, Transcetolase) O=C(H) / H—C—OH / $CH_2OPO_3^{2-}$ + $CH_2OH$ / C=O / HO—C—H / H—C—OH / H—C—OH / $CH_2OPO_3^{2-}$

Xilulose-5--fosfato | Eritrose-4--fosfato | Gliceraldeído-3--fosfato | Frutose-6--fosfato

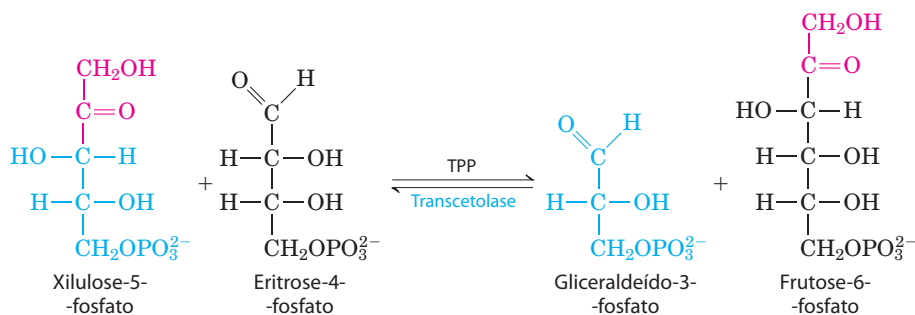



**FIGURA 14-26 A segunda reação catalisada pela transcetolase.**

**(a) Transcetolase**

OH, $HOH_2C$—C, R—N, S, $CH_3$, R′, 1, 2, 3, 4, 5 — TPP ⟷ Estabilização por ressonância ⟷ OH, $HOH_2C—C^-$, R—$N^+$, S, $CH_3$, R′

**(b) Transaldolase**

$CH_2OH$, Lys, N, C, C, OH, H, H — Base de Schiff protonada ⟷ Estabilização por ressonância ⟷ $CH_2OH$, Lys, $N^+$, C, $C^-$, OH, H, H

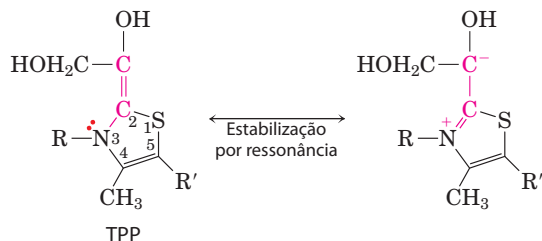
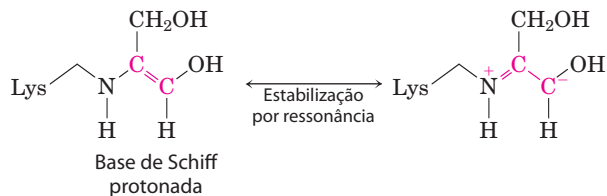



**FIGURA 14-27 Intermediários carbânions estabilizados por interações covalentes com a transcetolase e a transaldolase.** **(a)** O anel da TPP estabiliza o carbânion no grupo hidroxietil transportado pela transcetolase; ver Figura 14-15 para a química da ação da TPP. **(b)** Na reação da transaldolase, a base de Schiff protonada formada entre o grupo $\varepsilon$-amino da cadeia lateral de uma Lys e o substrato estabiliza o carbânion C-3 formado após a clivagem aldólica.

O processo descrito na Figura 14-22 é conhecido como a **via oxidativa das pentoses-fosfato**. A primeira e a terceira etapa são oxidações com grandes variações negativas de energia livre padrão e são essencialmente irreversíveis na célula. As reações da parte não oxidativa da via das pentoses-fosfato (Figura 14-23) são prontamente reversíveis e assim também proporcionam uma maneira de converter hexoses-fosfato a pentoses-fosfato. Como será visto no Capítulo 20, o processo que converte hexoses-fosfato a pentoses-fosfato é crucial para a fixação fotossintética de $CO_2$ pelas plantas. Essa via, a **via redutora das pentoses-fosfato**, é essencialmente o inverso das reações mostradas na Figura 14-23 e utiliza muitas das mesmas enzimas.

Todas as enzimas da via das pentoses-fosfato estão localizadas no citosol, como aquelas da glicólise e a maioria das enzimas da gliconeogênese. De fato, essas três vias estão conectadas por meio de vários intermediários e enzimas compartilhados. O gliceraldeído-3-fosfato formado pela ação da transcetolase é prontamente convertido a di-hidroxiacetona-fosfato pela enzima glicolítica triose-fosfato-isomerase, e essas duas trioses podem ser unidas pela aldolase como na gliconeogênese, formando frutose-1,6-bifosfato. Alternativamente, a triose-fosfato pode ser oxidada a piruvato pelas reações glicolíticas. O destino das trioses é determinado pelas necessidades relativas das células por pentoses-fosfato, NADPH e ATP.

## A síndrome de Wernicke-Korsakoff é exacerbada por um defeito na transcetolase

A síndrome de Wernicke-Korsakoff é um distúrbio causado por uma deficiência grave de tiamina, componente da TPP. A síndrome é mais comum entre pessoas alcoólatras do que na população em geral porque o consumo crônico e intenso de álcool interfere com a absorção intestinal de tiamina. A síndrome pode ser exacerbada por uma mutação no gene da transcetolase que resulta em uma enzima com baixa afinidade por TPP – uma afinidade dez vezes menor que a normal. Esse defeito torna os indivíduos muito mais sensíveis à deficiência de tiamina: mesmo uma deficiência moderada de tiamina (tolerável por indivíduos com transcetolase não mutada) faz o nível de TPP cair abaixo daquele necessário para saturar a enzima. O resultado é uma redução da velocidade de toda via das pentoses-fosfato. Em pessoas com a síndrome de Wernicke-Korsakoff isso resulta no agravamento dos sintomas, que podem incluir perda severa da memória, confusão mental e paralisia parcial. ■

**FIGURA 14-28 Papel do NADPH na regulação da partilha da glicose-6-fosfato entre a glicólise e a via das pentoses-fosfato.** Quando NADPH é formado mais rápido do que está sendo consumido para biossíntese e redução da glutationa (ver Figura 14-21), a [NADPH] aumenta e inibe a primeira enzima da via das pentoses-fosfato. Como resultado, mais glicose-6--fosfato está disponível para glicólise.

## A glicose-6-fosfato é repartida entre a glicólise e a via das pentoses-fosfato

A entrada da glicose-6-fosfato na glicólise ou na via das pentoses-fosfato depende das necessidades momentâneas da célula e da concentração de $NADP^+$ no citosol. Na ausência deste aceptor de elétrons, a primeira reação da via das pentoses-fosfato (catalisada por G6PD) não pode prosseguir. Quando a célula está convertendo rapidamente NADPH em $NADP^+$ em reduções biossintéticas, o nível de $NADP^+$ eleva-se, estimulando alostericamente G6PD e dessa forma aumentando o fluxo de glicose-6-fosfato pela via das pentoses-fosfato (**Figura 14-28**). Quando a demanda por NADPH é menor, o nível de $NADP^+$ diminui, a via das pentoses-fosfato também diminui, e a glicose-6-fosfato é usada para alimentar a glicólise.

## RESUMO 14.5 Oxidação da glicose pela via das pentoses-fosfato

- A via *oxidativa* das pentoses-fosfato (via do fosfogliconato ou via da hexose-monofosfato) realiza a oxidação e a descarboxilação da glicose-6-fosfato em C-1, reduzindo $NADP^+$ em NADPH e produzindo as pentoses--fosfato.
- O NADPH fornece a força redutora para as reações biossintéticas, e a ribose-5-fosfato é um precursor para a síntese de nucleotídeos e ácidos nucleicos. Tecidos em crescimento rápido e tecidos realizando biossíntese ativa de ácidos graxos, colesterol ou hormônios esteroides enviam mais glicose-6-fosfato para a via das pentoses--fosfato do que os tecidos com menor demanda por pentoses-fosfato e poder redutor.
- A primeira fase da via das pentoses-fosfato consiste em duas oxidações, que convertem glicose-6-fosfato a ribulose-5-fosfato e reduzem $NADP^+$ a NADPH. A segunda fase compreende etapas não oxidativas que convertem pentoses-fosfato a glicose-6-fosfato, que inicia o ciclo novamente.
- Na segunda fase, a transcetolase (com TPP como cofator) e a transaldolase catalisam a interconversão de açúcares de três, quatro, cinco, seis e sete átomos de carbono, com a conversão reversível de seis pentoses--fosfato a cinco hexoses-fosfato. Nas reações de fixação de carbono da fotossíntese, as mesmas enzimas catalisam o processo inverso, a via *redutora* das pentoses--fosfato: a conversão de cinco hexoses-fosfato a seis pentoses-fosfato.
- Um defeito genético da transcetolase provoca a diminuição da sua afinidade por TPP e agrava a síndrome de Wernicke-Korsakoff.
- A entrada de glicose-6-fosfato na via glicolítica ou na via das pentoses-fosfato é basicamente determinada pelas concentrações relativas de $NADP^+$ e NADPH.

## Termos-chave

*Os termos em negrito estão definidos no glossário.*

**glicólise** 544
**fermentação** 544
fermentação láctica 546
**hipoxia** 546
**fermentação etanólica (alcoólica)** 546
**isoenzimas** 548
**acil-fosfato** 552
**fosforilação no nível do substrato** 553
**fosforilação ligada à respiração** 553
fosfoenolpiruvato (PEP) 554
**mutases** 560
**isomerases** 560
intolerância à lactose 561
galactosemia 562
**tiamina-pirofosfato (TPP)** 565
**gliconeogênese** 568
biotina 570
**via das pentoses-fosfato** 575
**via do fosfogliconato** 575
**via da hexose-monofosfato** 575

## Leituras adicionais


### Geral

**Fruton, J.S.** (1999) *Proteins, Genes, and Enzymes: The Interplay of Chemistry and Biology*, Yale University Press, New Haven.
Este texto inclui uma detalhada consideração histórica sobre a pesquisa em glicólise.

### Glicólise

**Boiteux, A. & Hess, B.** (1981) Design of glycolysis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **293**, 5–22.
Uma revisão de nível intermediário da via e da visão clássica de seu controle.

**Dandekar, T., Schuster, S., Snel, B., Huynen, M., & Bork, P.** (1999) Pathway alignment: application to the comparative analysis of glycolytic enzymes. *Biochem. J.* **343**, 115–124.
Uma revisão de nível intermediário sobre a visão bioinformática da evolução da glicólise.

**Dang, C.V. & Semenza, G.L.** (1999) Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 68–72.
Uma breve revisão sobre as bases moleculares para o aumento da glicólise em tumores.

**Erlandsen, H., Abola, E.E., & Stevens, R.C.** (2000) Combining structural genomics and enzymology: completing the picture in metabolic pathways and enzyme active sites. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 719–730.
Uma revisão de nível intermediário sobre as estruturas das enzimas glicolíticas.

**Gatenby, R.A. & Gillies, R.J.** (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* **4**, 891–899.

**Hardie, D.G.** (2000) Metabolic control: a new solution to an old problem. *Curr. Biol.* **10**, R757–R759.

**Harris, A.L.** (2002) Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 38–47.

**Heinrich, R., Melendez-Hevia, E., Montero, F., Nuno, J.C., Stephani, A., & Waddell, T.D.** (1999) The structural design of glycolysis: an evolutionary approach. *Biochem. Soc. Trans.* **27**, 294–298.

**Herling, A., König, M., Bulik, S., & Holzhütter, H.G.** (2011) Enzymatic features of the glucose metabolism in tumor cells. *FEBS J.* **278**, 2436–2459.

**Keith, B. & Simon, M.C.** (2007) Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell* **129**, 465–472.
Revisão de nível intermediário.

**Knowles, J. & Albery, W.J.** (1977) Perfection in enzyme catalysis: the energetics of triose phosphate isomerase. *Acc. Chem. Res*. **10**, 105–111.

**Kresge, N., Simoni, R.D., & Hill, R.L.** (2005) Otto Fritz Meyerhof and the elucidation of the glycolytic pathway. *J. Biol. Chem*. **280**, e3.
Uma breve revisão sobre os artigos clássicos, que também estão disponíveis *on-line*.

**Kritikou, E.** (2006) p53 turns on the energy switch. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **7**, 552–553.

**Pelicano, H., Martin, D.S., Zu, R-H., & Huang, P.** (2006) Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* **25**, 4633–4646.
Revisão de nível intermediário.

**Phillips, D., Blake, C.C.F., & Watson, H.C. (eds).** (1981) The Enzymes of Glycolysis: Structure, Activity and Evolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **293**, 1–214.
Uma coleção de excelentes revisões sobre as enzimas glicolíticas, escrita em nível desafiador, mas compreensível para o estudante iniciante em bioquímica.

**Plaxton, W.C.** (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 185–214.
Uma revisão muito útil sobre a localização subcelular das enzimas glicolíticas e a regulação da glicólise em plantas.

**Rose, I.** (1981) Chemistry of proton abstraction by glycolytic enzymes (aldolase, isomerases, and pyruvate kinase). *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **293**, 131–144.
Revisão de nível intermediário sobre os mecanismos dessas enzimas.

**Shirmer, T. & Evans, P.R.** (1990) Structural basis for the allosteric behavior of phosphofructokinase. *Nature* **343**, 140–145.

**Smith, T.A.** (2000) Mammalian hexokinases and their abnormal expression in cancer. *Br. J. Biomed. Sci.* **57**, 170–178.
Uma revisão sobre as quatro enzimas hexocinases de mamíferos: suas propriedades, distribuição tecidual e sua expressão durante o desenvolvimento de tumores.

### Vias alimentadoras da glicólise

**Elsas, L.J. & Lai, K.** (1998) The molecular biology of galactosemia. *Genet. Med.* **1**, 40–48.

**Novelli, G. & Reichardt, J.K.** (2000) Molecular basis of disorders of human galactose metabolism: past, present, and future. *Mol. Genet. Metab.* **71**, 62–65.

**Petry, K.G. & Reichardt, J.K.** (1998) The fundamental importance of human galactose metabolism: lessons from genetics and biochemistry. *Trends Genet.* **14**, 98–102.

**Van Beers, E.H., Buller, H.A., Grand, R.J., Einerhand, A.W.C., & Dekker, J.** (1995) Intestinal brush border glycohydrolases: structure, function, and development. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **30**, 197–262.

### Fermentações

**Demain, A.L., Davies, J.E., Atlas, R.M., Cohen, G., Hershberger, C.L., Hu, W.-S., Sherman, D.H., Willson, R.C., & Wu, J.H.D. (eds).** (1999) *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington, DC.
Introdução clássica a todos os aspectos das fermentações industriais.

**Liese, A., Seelbach, K., & Wandrey, C. (eds).** (2006) *Industrial Biotransformations*, John Wiley & Sons, New York.
O uso de microrganismos na indústria para a síntese de produtos valiosos a partir de matérias-primas baratas.

**Sticklen, M.B.** (2008) Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 433–443.

### Gliconeogênese

**Aschenback, J.R., Kristensen, N.B., Donkin, S.S., Hammon, H.M., & Penner, G.B.** (2010) Gluconeogenesis in dairy cows: the secret of making sweet milk from sour dough. *IUBMB Life* 62, 869–877.

**Gerich, J.E., Meyer, C., Woerle, H.J., & Stumvoll, M.** (2001) Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care* **24**, 382–391.
Revisão de nível intermediário sobre a contribuição do tecido renal à gliconeogênese.

**Gleeson, T.** (1996) Post-exercise lactate metabolism: a comparative review of sites, pathways, and regulation. *Annu. Rev. Physiol.* **58**, 565–581.

**Hers, H.G. & Hue, L.** (1983) Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 617–653.

**Matte, A., Tari, L.W., Goldie, H., & Delbaere, L.T.J.** (1997) Structure and mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 8105–8108.

### Via oxidativa das pentoses-fosfato

**Chayen, J., Howat, D.W., & Bitensky, L.** (1986) Cellular biochemistry of glucose 6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase activities. *Cell Biochem. Funct.* **4**, 249–253.

**Horecker, B.L.** (1976) Unraveling the pentose phosphate pathway. In *Reflections on Biochemistry* (Kornberg, A., Cornudella, L., Horecker, B.L., & Oro, J., eds), pp. 65–72, Pergamon Press, Inc., Oxford.

**Kletzien, R.F., Harris, P.K., & Foellmi, L.A.** (1994) Glucose 6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J.* **8**, 174–181.

Uma revisão de nível intermediário.

**Kresge, N., Simoni, R.D., & Hill, R.L.** (2005) Bernard L. Horecker's contributions to elucidating the pentose phosphate pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, e26.

Uma breve revisão sobre os artigos clássicos, que estão disponíveis *on-line*.

**Martini, G. & Ursini, M.V.** (1996) A new lease on life for an old enzyme. *BioEssays* **18**, 631–637.

Uma revisão de nível intermediário sobre a glicose-6-fosfato-desidrogenase, os efeitos de mutações nessa enzima em humanos e os efeitos de mutação *knock-out* em comundongos.

**Notaro, R., Afolayan, A., & Luzzatto, L.** (2000) Human mutations in glucose 6-phosphate dehydrogenase reflect evolutionary history. *FASEB J.* **14**, 485–494.

**Perl, A., Hanczko, R., Relarico, T., Oaks, Z., & Landas, S.** (2011) Oxidative stress, inflammation and carcinogenesis are controlled through the pentose phosphate pathway by transaldolase. *Trends Mol. Med.* **17**, 395–403.

**Saggerson, D.** (2009) Getting to grips with the pentose phosphate pathway in 1953. *Biochem J.* (doi:10.1042/BJ20081961).

**Vulliamy, T., Mehta, A., Luzzatto, L.** (2006) Glucose 6-Phosphate Dehydrogenas Deficiency. In *Scriver's Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Valle, D., Beaudet, A.L., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., Antonarakis, S.E., Ballabio, A., eds) (http://dx.doi.org/10.1036/ommbid.212).

Essa clássica enciclopédia médica, última publicação em 2001 como um conjunto de quatro volumes, agora é mantida *on-line* (www.ommbid.com). Ela contém descrições dos aspectos clínicos, bioquímicos e genéticos de centenas de doenças metabólicas humanas – uma fonte autorizada e leitura fascinante.

**Wood, T.** (1985) *The Pentose Phosphate Pathway*, Academic Press, Inc., Orlando, FL.

**Wood, T.** (1986) Physiological functions of the pentose phosphate pathway. *Cell Biochem. Funct.* **4**, 241–247.

## Problemas

**1. Equação para a fase preparatória da glicólise.** Escreva equações bioquímicas equilibradas para todas as reações do catabolismo da glicose em duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato (a fase preparatória da glicólise), incluindo a variação de energia livre padrão para cada reação. Depois escreva a equação global ou líquida para a fase preparatória da glicólise, com a variação de energia livre padrão líquida.

**2. Fase de pagamento da glicólise em músculo esquelético.** No músculo esquelético em atividade, sob condições anaeróbias, o gliceraldeído-3-fosfato é convertido a piruvato (a fase de pagamento da glicólise), e o piruvato é reduzido a lactato. Escreva as equações equilibradas para todas as reações desse processo, com a variação de energia livre padrão para cada reação. Depois escreva a equação global ou líquida para a fase de pagamento da glicólise (com o lactato como produto final), incluindo a variação de energia livre padrão líquida.

**3. Os transportadores GLUT.** Compare a localização de GLUT4 com a de GLUT2 e GLUT3, e explique por que essas localizações são importantes na resposta do músculo, do tecido adiposo, do cérebro e do fígado à insulina.

**4. Produção de etanol em leveduras.** As leveduras (*S. cerevisiae*), quando crescem anaerobiamente em meio com glicose, convertem piruvato em acetaldeído, e então reduzem o acetaldeído em etanol usando elétrons do NADH. Escreva a equação para a segunda reação, e calcule sua constante de equilíbrio a 25°C, utilizando os potenciais de redução padrão que estão na Tabela 13-7.

**5. Variações energéticas da reação da aldolase.** A aldolase catalisa a reação glicolítica

$$\text{Frutose-1,6-bifosfato} \longrightarrow \text{gliceraldeído-3-fosfato} + \text{di-hidroxiacetona-fosfato}$$

A variação de energia livre padrão para esta reação no sentido descrito é +23,8 kJ/mol. As concentrações dos três intermediários no hepatócito de um mamífero são frutose-1,6-bifosfato, $1{,}4 \times 10^{-5}$ M; gliceraldeído-3-fosfato, $3 \times 10^{-6}$ M; di-hidroxiacetona-fosfato, $1{,}6 \times 10^{-5}$ M. Qual é a variação de energia livre para essa reação na temperatura corporal (37°C)?

**6. O caminho dos átomos na fermentação.** Um experimento de "pulso e caça" usando fontes de carbono marcadas com $^{14}C$ é realizado em extrato de levedura mantida em condições rigorosas de anaerobiose para produzir etanol. O experimento consiste na incubação de pequena quantidade do substrato marcado com $^{14}C$ (o pulso) com o extrato de levedura, apenas o tempo necessário para cada intermediário da via de fermentação tornar-se marcado. A marcação é então "caçada" ao longo da via pela adição de excesso de glicose não marcada. A caça impede efetivamente qualquer entrada adicional de glicose marcada na via.

(a) Se [1-$^{14}C$]glicose (glicose marcada em C-1 com $^{14}C$) é utilizada como substrato, qual é a localização do $^{14}C$ no etanol produzido? Explique.

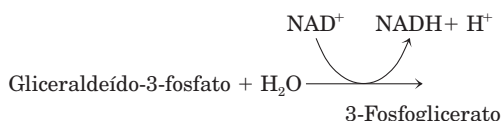
(b) Onde teria que estar localizado $^{14}C$ na glicose inicial para assegurar que toda atividade do $^{14}C$ seja liberada como $^{14}CO_2$ durante a fermentação a etanol? Explique.

**7. O calor das fermentações.** Os fermentadores industriais de larga escala geralmente requerem resfriamento constante e eficaz. Por quê?

**8. A fermentação para a produção de molho de soja.** Molho de soja é preparado por fermentação de uma mistura salgada de feijão de soja e trigo com vários microrganismos, incluindo leveduras, ao longo de um período de 8 a 12 meses. O molho resultante (depois da remoção dos sólidos) é rico em lactato e etanol. Como esses dois compostos são produzidos? Para evitar que o molho de soja tenha um gosto forte de vinagre (vinagre é ácido acético diluído), o oxigênio deve ser mantido fora do tanque de fermentação. Por quê?

**9. Equivalência das trioses-fosfato.** Gliceraldeído-3-fosfato marcado com $^{14}C$ foi adicionado a um extrato de levedura. Após um curto período de tempo, foi isolada frutose-1,6-bifosfato marcada com $^{14}C$ em C-3 e C-4. Qual era a localização do $^{14}C$ no gliceraldeído-3-fosfato inicial? De onde veio a segunda marcação com $^{14}C$ na frutose-1,6-bifosfato? Explique.

**10. Atalho da glicólise.** Suponha que você descobriu uma levedura mutante cuja via glicolítica foi encurtada devido à presença de uma nova enzima que catalisa a reação

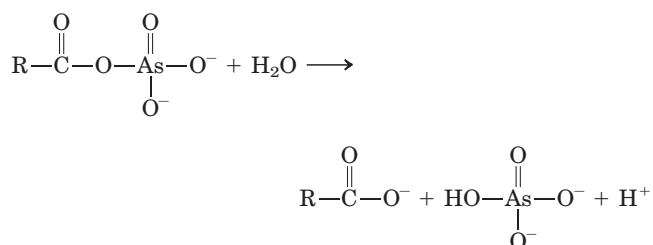
$$\text{Gliceraldeído-3-fosfato} + H_2O \xrightarrow{NAD^+ \;\; NADH + H^+} \text{3-Fosfoglicerato}$$

O encurtamento da via glicolítica resultante beneficiaria a célula? Explique.

**11. Papel da lactato-desidrogenase.** Durante atividade intensa, a demanda por ATP no tecido muscular aumenta muito. Nos músculos das pernas do coelho ou no músculo das asas do peru, o ATP é produzido quase exclusivamente por fermentação láctica. O ATP é formado na fase de pagamento da glicólise por meio de duas reações, promovidas pela fosfoglicerato-cinase e pela piruvato-cinase. Suponha que o músculo esquelético seja desprovido da lactato-desidrogenase. Poderia ele desenvolver atividade física vigorosa, ou seja, gerar ATP em alta taxa pela glicólise? Explique.

**12. Eficiência da produção de ATP no músculo.** A transformação de glicose a lactato nos miócitos libera apenas em torno de 7% da energia livre liberada quando a glicose é completamente oxidada a $CO_2$ e $H_2O$. Isso significa que a glicólise anaeróbia no músculo é um desperdício de glicose? Explique.

**13. Variação da energia livre para a oxidação das trioses-fosfato.** A oxidação do gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato, catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, ocorre com uma constante de equilíbrio desfavorável ($K'_{eq}$ = 0,08; $\Delta G'^{\circ}$ = 6,3 kJ/mol), mas o fluxo por esse ponto da via glicolítica ocorre facilmente. Como a célula supera o equilíbrio desfavorável?

**14. Envenenamento por arsenato.** A arsenato é estrutural e quimicamente similar ao fosfato inorgânico ($P_i$), e muitas enzimas que necessitam de fosfato também usariam o arsenato. No entanto, os compostos orgânicos de arsenato são menos estáveis do que os compostos de fosfato análogos. Por exemplo, acil-*arsenatos* se decompõem rapidamente por hidrólise:

$$R{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}O{-}\overset{O}{\overset{\|}{\underset{O^-}{\underset{|}{As}}}}{-}O^- + H_2O \longrightarrow R{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}O^- + HO{-}\overset{O}{\overset{\|}{\underset{O^-}{\underset{|}{As}}}}{-}O^- + H^+$$

Por outro lado, acil-*fosfatos*, como o 1,3-bifosfoglicerato, são mais estáveis e são transformados nas células por meio de ação enzimática.

(a) Antecipe o efeito na reação líquida catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase se o fosfato fosse substituído por arsenato.

(b) Qual seria a consequência para um organismo se o fosfato fosse substituído por arsenato? O arsenato é muito tóxico para a maioria dos organismos. Explique por quê.

**15. Necessidade de fosfato para a fermentação alcoólica.** Em 1906, Harden e Young, em uma série de estudos clássicos sobre a fermentação da glicose a etanol e $CO_2$ por extratos de leveduras de cerveja, fizeram as seguintes observações: (1) Fosfato inorgânico foi essencial para a fermentação; quando o suprimento de fosfato esgotava, a fermentação parava antes que toda a glicose fosse utilizada. (2) Durante a fermentação nessas condições havia acúmulo de etanol, $CO_2$ e uma hexose-bifosfato. (3) Quando arsenato era substituído por fosfato, a hexose-bifosfato não se acumulava, e a fermentação ocorria até que toda glicose fosse convertida a etanol e $CO_2$.

(a) Por que a fermentação cessa quando o suprimento de fosfato se esgota?

(b) Por que etanol e $CO_2$ se acumulam? A conversão de piruvato em etanol e $CO_2$ é essencial? Por quê? Identifique a hexose-bifosfato que se acumula. Por que ela se acumula?

(c) Por que a substituição de fosfato por arsenato previne o acúmulo da hexose-bifosfato, mas permite que a fermentação a etanol e $CO_2$ se complete? (ver Problema 14.)

**16. Papel da vitamina niacina.** Adultos engajados em exercício físico intenso requerem, para nutrição adequada, uma ingestão de cerca de 160 g de carboidrato diariamente, mas apenas em torno de 20 mg de niacina. Dado o papel da niacina na glicólise, como você explica essa observação?

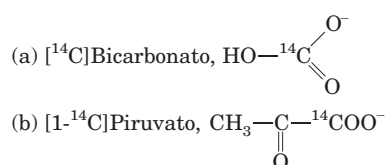
**17. Síntese do glicerol-fosfato.** O glicerol-3-fosfato necessário para a síntese de glicerofosfolipídeos pode ser sintetizado a partir de um intermediário glicolítico. Proponha uma sequência de reações para essa conversão.

**18. Gravidade dos sintomas clínicos devido à deficiência de enzimas.** Os sintomas clínicos das duas formas de galactosemia – deficiência de galactocinase ou de UDP-glicose:galactose-1-fosfato-uridiltransferase – mostram severidades radicalmente diferentes. Embora os dois tipos provoquem desconforto gástrico após a ingestão de leite, a deficiência da transferase também leva a disfunções do fígado, dos rins, do baço, do cérebro e finalmente à morte. Quais produtos se acumulam no sangue e nos tecidos em cada tipo de deficiência enzimática? Estime as toxicidades relativas desses produtos a partir da informação acima.

**19. Definhamento dos músculos durante o jejum prolongado.** Uma consequência do jejum prolongado é a redução da massa muscular. O que acontece com as proteínas musculares?

**20. A via dos átomos na gliconeogênese.** Um extrato de fígado capaz de realizar todas as reações metabólicas normais do fígado é incubado por um curto período, em experimentos distintos, com os seguintes precursores marcados com $^{14}C$.

(a) [$^{14}C$]Bicarbonato, $HO{-}^{14}C(=O){-}O^-$

(b) [1-$^{14}C$]Piruvato, $CH_3{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}{-}^{14}COO^-$

Trace a via de cada precursor ao longo da gliconeogênese. Indique a localização do $^{14}C$ em todos os intermediários e no produto, a glicose.

**21. Custo energético de um ciclo de glicólise e gliconeogênese.** Qual é o custo (em equivalentes de ATP) de transformar glicose em piruvato pela via glicolítica e de este voltar à glicose pela gliconeogênese?

**22. Relação entre gliconeogênese e glicólise.** Por que é importante que a gliconeogênese não seja o inverso exato da glicólise?

**23. Variações energéticas da reação da piruvato-cinase.** Explique em termos bioenergéticos como a conversão de piruvato a fosfoenolpiruvato na gliconeogênese supera a grande variação negativa da energia livre padrão da reação da piruvato-cinase na glicólise.

**24. Substratos glicogênicos.** Um procedimento comum para determinar a eficiência de um composto como precursor de glicose em mamíferos é manter um animal faminto até que os estoques de glicogênio do fígado sejam consumidos e então administrar o composto em questão. O substrato que levar a um aumento líquido do glicogênio hepático é chamado de glicogênico, porque ele deve ser primeiro convertido a glicose-6-fosfato. Mostre por meio de reações enzimáticas conhecidas quais substratos a seguir são glicogênicos.

(a) Succinato, $^{-}OOC—CH_2—CH_2—COO^{-}$

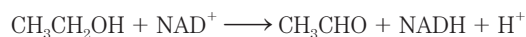
(b) Glicerol, $CH_2(OH)—CH(OH)—CH_2(OH)$

(c) Acetil-CoA, $CH_3—C(=O)—S\text{-}CoA$

(d) Piruvato, $CH_3—C(=O)—COO^{-}$

(e) Butirato, $CH_3—CH_2—CH_2—COO^{-}$

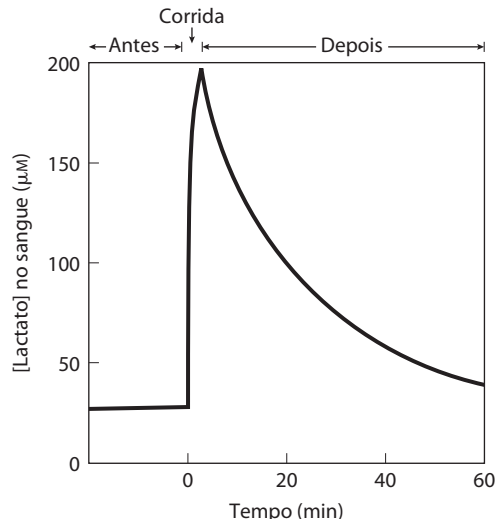
**25. O etanol afeta os níveis de glicose no sangue.** O consumo de álcool (etanol), especialmente após períodos de atividade intensa ou depois de várias horas sem comer, resulta em uma deficiência de glicose no sangue, uma condição conhecida como hipoglicemia. A primeira etapa no metabolismo do etanol pelo fígado é a oxidação a acetaldeído, catalisada pela álcool-desidrogenase hepática:

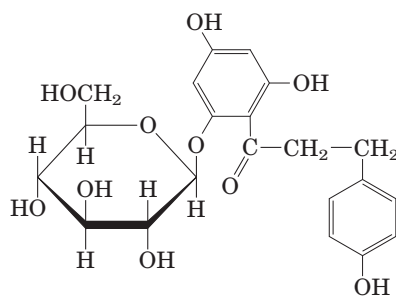
$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \longrightarrow CH_3CHO + NADH + H^+$$

Explique como essa reação inibe a transformação de lactato em piruvato. Por que isso leva à hipoglicemia?

**26. Níveis de lactato no sangue durante exercício intenso.** As concentrações de lactato no plasma sanguíneo antes, durante e depois de uma corrida de 400 m estão mostradas no gráfico.

(a) O que causa o rápido aumento na concentração de lactato?

(b) O que causa o declínio da concentração de lactato após o término da corrida? Por que o declínio ocorre mais lentamente do que o aumento?

(c) Por que a concentração de lactato não é zero durante o estado de repouso?

**27. Relação entre frutose-1,6-bifosfato e os níveis de lactato no sangue.** Um defeito congênito na enzima hepática 1,6-bifosfatase resulta em níveis de lactato anormalmente altos no plasma sanguíneo. Explique.

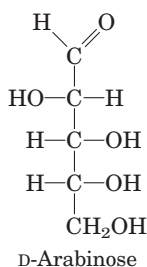
**28. Efeito da florizina no metabolismo dos carboidratos.** A florizina, um glicosídeo tóxico da casca da pereira, bloqueia a reabsorção normal de glicose no túbulo renal, fazendo com que a glicose presente no sangue seja quase completamente excretada na urina. Em um experimento, ratos alimentados com florizina e succinato de sódio excretaram cerca de 0,5 mol de glicose (sintetizada por gliconeogênese) para cada 1 mol de succinato de sódio ingerido. Como o succinato é transformado em glicose? Explique a estequiometria.

Florizina

**29. Excesso de captação de oxigênio durante a gliconeogênese.** O lactato absorvido pelo fígado é convertido em glicose, com o consumo de 6 móis de ATP por mol de glicose produzida. A extensão desse processo em uma preparação de fígado de rato pode ser monitorada pela administração de [$^{14}C$] lactato e pela medida da quantidade de [$^{14}C$]glicose produzida. Como a estequiometria entre o consumo de $O_2$ e a produção de ATP é conhecida (cerca de 5 ATP por $O_2$), pode-se predizer o consumo extra de $O_2$, acima da velocidade normal, quando uma dada quantidade de lactato é administrada. No entanto, quando o $O_2$ extra utilizado na síntese de glicose a partir de lactato é efetivamente medido, é sempre maior que o predito pela relação estequiométrica conhecida. Sugira uma explicação possível para essa observação.

**30. Papel da via das pentoses-fosfato.** Se a oxidação da glicose-6-fosfato pela via das pentoses-fosfato estivesse sendo utilizada para gerar principalmente NADPH para reações de biossíntese, o outro produto, ribose-5-fosfato, se acumularia. Que problemas isto poderia causar?

## Problema de análise de dados

**31. Criando um sistema de fermentação.** A fermentação de matéria vegetal para a produção de etanol combustível é um método potencial para reduzir o uso de combustíveis fósseis e assim as emissões de $CO_2$ que levam ao aquecimento global. Muitos microrganismos podem degradar celulose e então fermentar a glicose a etanol. No entanto, muitas fontes potenciais de celulose, incluindo resíduos da agricultura e *switchgrass* (*Panicum virgatum*, gramínea perene nativa da América do Norte), também contêm quantidades substanciais de arabinose, que não é tão facilmente fermentada.

H—C=O
HO—C—H
H—C—OH
H—C—OH
$CH_2OH$

D-Arabinose

A *Escherichia coli* é capaz de fermentar arabinose a etanol, mas a bactéria não é naturalmente tolerante a altos níveis de etanol, dessa forma limitando sua utilidade para a produção de etanol comercial. Outra bactéria, *Zymomomas mobilis*, é naturalmente tolerante a altos níveis de etanol, mas não pode fermentar arabinose. Deanda, Zhang, Eddy e Picataggio (1996) descreveram seus esforços para combinar as principais características úteis desses dois organismos, introduzindo os genes das enzimas metabolizadoras de arabinose de *E. coli* em *Z. mobilis*.

(a) Por que essa é uma estratégia mais simples que o inverso: criar *E. coli* mais tolerante a etanol?

Deanda e colaboradores inseriram cinco genes de *E. coli* no genoma de *Z. mobilis*: *araA*, codifica L-arabinose-isomerase, que interconverte L-arabinose em L-ribulose; *araB*, L-ribulocinase, que usa ATP para fosforilar L-ribulose em C-5; *araD*, L-ribulose-5-fosfato-epimerase, que interconverte L-ribulose-5--fosfato em L-xilulose-5-fosfato; *talB*, transaldolase; e, *tktA*, transcetolase.

(b) Descreva brevemente a transformação química catalisada por cada uma das três enzimas *ara* e, quando possível, indique uma enzima discutida neste capítulo que realize uma reação análoga.

Os cinco genes de *E. coli* inseridos em *Z. mobilis* permitiram a entrada da arabinose na fase não oxidativa da via das pentoses-fosfato (Figura 14-23), na qual ela foi convertida em glicose-6-fosfato e fermentada a etanol.

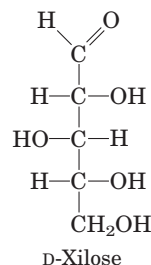
(c) As três enzimas converteram enfim a arabinose em que açúcar?

(d) O produto da parte (c) alimenta a via mostrada na Figura 14-23. Combinando as cinco enzimas de *E. coli* listadas com as enzimas dessa via, descreva a via global para a fermentação de seis moléculas de arabinose a etanol.

(e) Qual é a estequiometria da fermentação de seis moléculas de arabinose a etanol e $CO_2$? Quantas moléculas de ATP você esperaria que essa reação gerasse?

(f) *Zymomonas mobilis* utiliza uma via para a fermentação etanólica levemente diferente daquela descrita neste capítulo. Como resultado, o rendimento de ATP esperado é apenas 1 ATP por molécula de arabinose. Apesar disso ser menos benéfico para a bactéria, é melhor para a produção de etanol. Por quê?

Outro açúcar comumente encontrado em material vegetal é a xilose.

H—C=O
H—C—OH
HO—C—H
H—C—OH
$CH_2OH$

D-Xilose

(g) Quais enzimas adicionais você precisaria introduzir na linhagem de *Z. mobilis* modificada, descrita anteriormente, para capacitá-la a usar xilose assim como arabinose para produzir etanol? Você não precisa nomear as enzimas (elas nem mesmo devem existir); apenas cite as reações que elas precisariam catalisar.

### Referência

**Deanda, K., Zhang, M., Eddy, C., & Picataggio, S.** (1996) Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4465-4470.

15

# Princípios da Regulação Metabólica



A regulação metabólica, tema central em bioquímica, é um dos aspectos mais marcantes dos organismos vivos. Entre os milhares de reações catalisadas por enzimas que ocorrem nas células, é provável que não exista uma que escape de alguma forma de regulação. Essa necessidade de regular cada aspecto do metabolismo celular se torna clara quando se examina a complexidade das sequências de reações metabólicas. Embora para o estudante de bioquímica seja conveniente dividir os processos metabólicos em "vias" que desempenham papéis distintos na economia celular, tal separação não existe na célula viva. Ao contrário, cada via discutida neste livro está indissociavelmente entrelaçada em uma rede multidimensional de reações com todas as outras vias celulares (**Figura 15-1**). Por exemplo, no Capítulo 14 foram discutidos quatro destinos possíveis para a **glicose-6-fosfato** em um hepatócito: degradação pela glicólise para a produção de ATP, degradação na via das pentoses-fosfato para a produção de NADPH e pentoses-fosfato, usados na síntese de polissacarídeos complexos da matriz extracelular, ou hidrólise em glicose e fosfato para repor a glicose sanguínea. Na verdade, a glicose-6-fosfato tem outros destinos possíveis nos hepatócitos; ela pode, por exemplo, ser usada para a síntese de outros açúcares, como glicosamina, galactose, galactosamina, fucose e ácido neuramínico, para a glicosilação de proteínas, ou pode ser parcialmente degradada para fornecer acetil-CoA para a síntese de ácidos graxos e esteróis. E a bactéria *Escherichia coli* pode usar a glicose para produzir o esqueleto carbônico de *cada um* dos seus vários milhares de tipos de moléculas. Quando uma célula qualquer utiliza a glicose-6-fosfato para um propósito, essa "decisão" afeta todas as outras vias nas quais esse açúcar é precursor ou intermediário: qualquer mudança na distribuição da glicose-6-fosfato para uma via afeta, direta ou indiretamente, o fluxo de metabólitos por todas as outras.

Tais mudanças na distribuição são comuns na vida das células. Louis Pasteur foi o primeiro a descrever o aumento de mais de 10 vezes no consumo de glicose em uma cultura de leveduras quando a cultura foi transferida da condição aeróbia para a anaeróbia. Esse "efeito Pasteur" ocorre sem mudança significativa nas concentrações de ATP ou da maioria das centenas de intermediários metabólicos e produtos derivados da glicose. Ocorre efeito semelhante nas células do músculo esquelético quando um corredor dispara na linha de largada. A capacidade da célula de executar simultaneamente todos esses processos metabólicos conectados – obter cada produto na quantidade necessária e no tempo certo, diante de grandes perturbações do meio externo e sem gerar sobras – é uma *impressionante* realização.

Este capítulo utiliza o metabolismo da glicose para ilustrar alguns princípios gerais da regulação metabólica. Primeiro aborda as funções gerais da regulação na manutenção da homeostasia metabólica e apresenta a análise do controle metabólico, um sistema de análise quantitativa de interações metabólicas complexas. Descreve as propriedades reguladoras específicas das enzimas do metabolismo da glicose; no Capítulo 14 descreve as atividades catalíticas das enzimas da glicólise e da gliconeogênese. Também discute as propriedades catalíticas e reguladoras das enzimas da síntese e da degradação do glicogênio, um dos casos melhor estudados de regulação metabólica. Observe que, ao selecionar o metabolismo de carboidratos para ilustrar os princípios da regulação metabólica, foi separado artificialmente o metabolismo das gorduras e dos carboidratos. Na verdade, essas duas atividades estão firmemente integradas, como será visto no Capítulo 23.

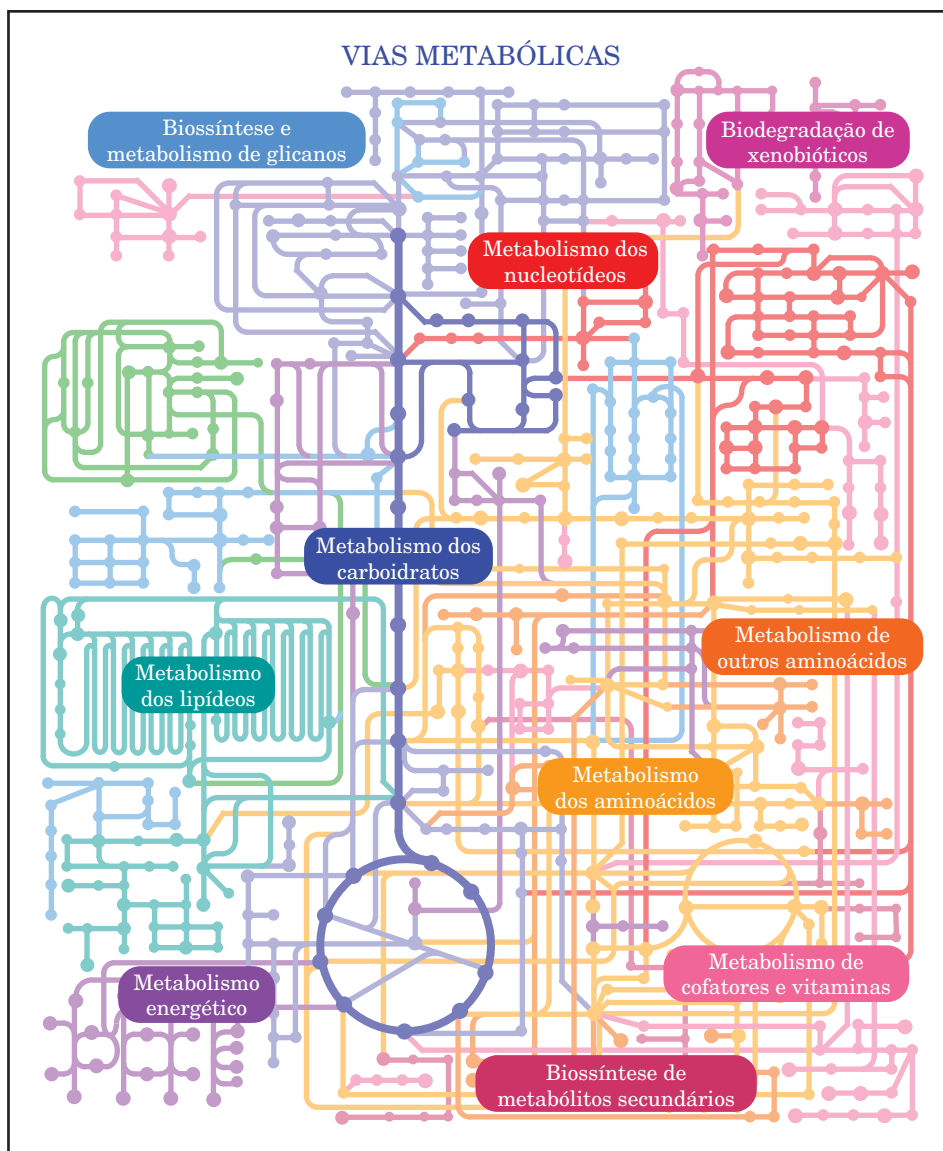



**FIGURA 15-1 O metabolismo como malha tridimensional.** Uma típica célula eucariótica tem a capacidade de produzir cerca de 30.000 proteínas diferentes, que catalisam milhares de reações diferentes envolvendo muitas centenas de metabólitos, muitos deles compartilhados por mais de uma "via". Nesta imagem resumida e muito simplificada das vias metabólicas, cada ponto representa um composto intermediário e cada linha de conexão representa uma reação enzimática. Consulte no banco de dados KEGG PATHWAY (www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map01100.html) um diagrama do metabolismo mais realístico e muito mais complexo. Neste mapa interativo, cada ponto pode ser clicado para se obter dados adicionais sobre o composto e as enzimas das quais ele é substrato. A capa deste livro mostra as reações entrelaçadas que ocorrem na mitocôndria.

## 15.1 Regulação das vias metabólicas

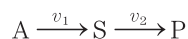
As vias do metabolismo da glicose fornecem, na direção catabólica, a energia essencial para se opor às forças de entropia e, na direção anabólica, precursores biossintéticos e uma forma de armazenamento da energia metabólica. Essas reações são tão importantes para a sobrevivência que mecanismos reguladores muito complexos evoluíram para assegurar que os metabólitos se desloquem ao longo de cada via na direção e na velocidade corretas para combinar exatamente com as condições variáveis da célula ou do organismo. Quando as condições externas se alteram, são feitos ajustes na velocidade do fluxo metabólico ao longo de uma via completa por uma grande variedade de mecanismos que operam em escalas de tempo diferentes.

As condições mudam às vezes de forma drástica. Por exemplo, a demanda por ATP nos músculos de voo dos insetos aumenta 100 vezes em poucos segundos quando o inseto alça voo. Nos humanos, a disponibilidade de oxigênio pode ser reduzida devido à hipoxia (redução da liberação de oxigênio aos tecidos) ou à isquemia (redução do fluxo sanguíneo para os tecidos). As proporções relativas de carboidrato, gordura e proteína na dieta variam de acordo com a refeição, e o suprimento de combustíveis obtido na dieta é intermitente, o que exige ajustes metabólicos entre as refeições e durante períodos de jejum. A cicatrização exige

quantidades muito grandes de energia e de precursores biossintéticos.

## As células e os organismos mantêm um estado estável dinâmico

Combustíveis como glicose entram na célula, e resíduos como o $CO_2$ saem dela, mas a massa e a composição total de uma célula, de um órgão ou de um animal adulto não se alteram de modo significativo ao longo do tempo; as células e os organismos existem em um estado estável dinâmico. Para cada reação metabólica em uma via, o substrato é fornecido pela reação precedente na mesma velocidade na qual é convertido em produto. Assim, apesar de a velocidade ($v$) da vazão metabólica, ou **fluxo**, por essa etapa da via poder ser alta e variável, a concentração do substrato, S, permanece constante. Assim, para a reação em duas etapas

$$A \xrightarrow{v_1} S \xrightarrow{v_2} P$$

quando $v_1 = v_2$, [S] é constante. Por exemplo, alterações na $v_1$ da entrada da glicose no sangue a partir de várias fontes é equilibrada por alterações na $v_2$ da captação da glicose por vários tecidos a partir do sangue, de forma que a concentração do açúcar no sangue ([S]) se mantém quase constante em 5 mM. Isso é **homeostasia** no nível molecular. As falhas nos mecanismos homeostáticos são frequentemente a causa de doenças humanas. No diabetes melito, por exemplo, a regulação da concentração sanguínea da glicose é deficiente como resultado da falta ou da insensibilidade à insulina, com consequências clínicas profundas.

Quando a perturbação externa não é meramente transitória, ou quando um tipo de célula se transforma em outro, os ajustes na composição celular e no metabolismo podem ser mais drásticos e requererem mudanças permanentes e significativas na alocação de energia e de precursores sintéticos, para alcançar um novo estado estável dinâmico. Considere, por exemplo, a diferenciação de células-tronco em eritrócitos na medula óssea. A célula precursora contém um núcleo, mitocôndrias, além de pouca ou nenhuma hemoglobina, enquanto o eritrócito totalmente diferenciado contém uma grande quantidade de hemoglobina, mas não tem núcleo nem mitocôndrias; a composição celular mudou permanentemente em resposta aos sinais externos de desenvolvimento, que acompanham as mudanças no metabolismo. Essa **diferenciação celular** requer uma regulação precisa dos níveis de cada proteína da célula.

Ao longo da evolução, os organismos adquiriram uma coleção admirável de mecanismos reguladores para a manutenção da homeostasia nos níveis molecular, celular e de organismo, o que se reflete na proporção de genes que codificam a maquinaria reguladora. Nos seres humanos, cerca de 4.000 genes (~12% de todos os genes) codificam proteínas reguladoras, incluindo uma grande variedade de receptores, de reguladores da expressão gênica e mais de 500 proteínas-cinases diferentes! Em muitos casos, os mecanismos reguladores se sobrepõem: uma enzima está sujeita à regulação por vários mecanismos diferentes.

## A quantidade de uma enzima e sua atividade catalítica podem ser reguladas

O fluxo de uma reação catalisada por uma enzima pode ser modulado por alterações no *número* de moléculas da enzima ou por alterações na *atividade catalítica* de cada uma das moléculas já presentes na reação. Tais alterações ocorrem em uma escala de tempo de milissegundos até muitas horas, em resposta a sinais de dentro ou de fora da célula. Mudanças alostéricas muito rápidas na atividade enzimática em geral são desencadeadas localmente, por alterações na concentração local de uma molécula pequena – um substrato da via na qual essa reação é uma das etapas (p. ex., glicose na glicólise), um produto da via (ATP da glicólise) ou um metabólito-chave ou cofator (como o NADH) que indica o estado metabólico da célula. Segundos mensageiros (como AMP cíclico e $Ca^{2+}$) gerados intracelularmente em resposta a sinais extracelulares (hormônios, citocinas e assim por diante) também controlam a regulação alostérica, em uma escala de tempo levemente mais lenta determinada pela velocidade dos mecanismos de transdução de sinal (ver Capítulo 12).

Os sinais extracelulares (**Figura 15-2**, ❶) podem ser hormonais (p. ex., insulina ou adrenalina) ou neuronais (acetilcolina), ou podem ser fatores de crescimento ou citocinas. O número de moléculas de determinada enzima em uma célula é função das taxas relativas de síntese e degradação desta enzima. A taxa de síntese pode ser ajustada pela ativação (em resposta a alguns sinais externos) de um fator de transcrição (Figura 15-2, ❷; descrito em mais detalhes no Capítulo 28). Os **fatores de transcrição** são proteínas nucleares que, quando ativadas, se ligam a regiões específicas do DNA (**elementos de resposta**) próximas a um promotor gênico (ponto de início de transcrição do gene) e ativam ou reprimem a transcrição do gene, levando ao aumento ou à redução da síntese da proteína codificada. A ativação de um fator de transcrição às vezes resulta de sua interação com um ligante específico ou de sua fosforilação ou desfosforilação. Cada gene é controlado por um ou mais elementos de resposta reconhecidos por fatores de transcrição específicos. Os genes que têm vários elementos de resposta são controlados por vários fatores de transcrição diferentes, respondendo a vários sinais diferentes. Grupos de genes que codificam proteínas que atuam em conjunto, como as enzimas da glicólise ou da gliconeogênese, frequentemente compartilham sequências de elementos de resposta comuns, de modo que um único sinal, agindo por meio de um determinado fator de transcrição, ativa ou reprime todos esses genes em conjunto. A regulação do metabolismo de carboidratos por fatores de transcrição específicos está descrita na Seção 15.3.

A estabilidade dos RNA mensageiros (mRNA) sua resistência à degradação por ribonucleases celulares (Figura 15-2, ❸) – varia, e a quantidade de um dado mRNA na célula é função de sua taxa de síntese e degradação (Capítulo 26). A taxa na qual um mRNA é traduzido em proteína pelos ribossomos (Figura 15-2, ❹) também é regulada e depende de vários fatores descritos em detalhe no Capítulo 27. Observe que um aumento de $n$ vezes em um mRNA nem sempre significa um aumento $n$ de vezes no seu produto proteico.

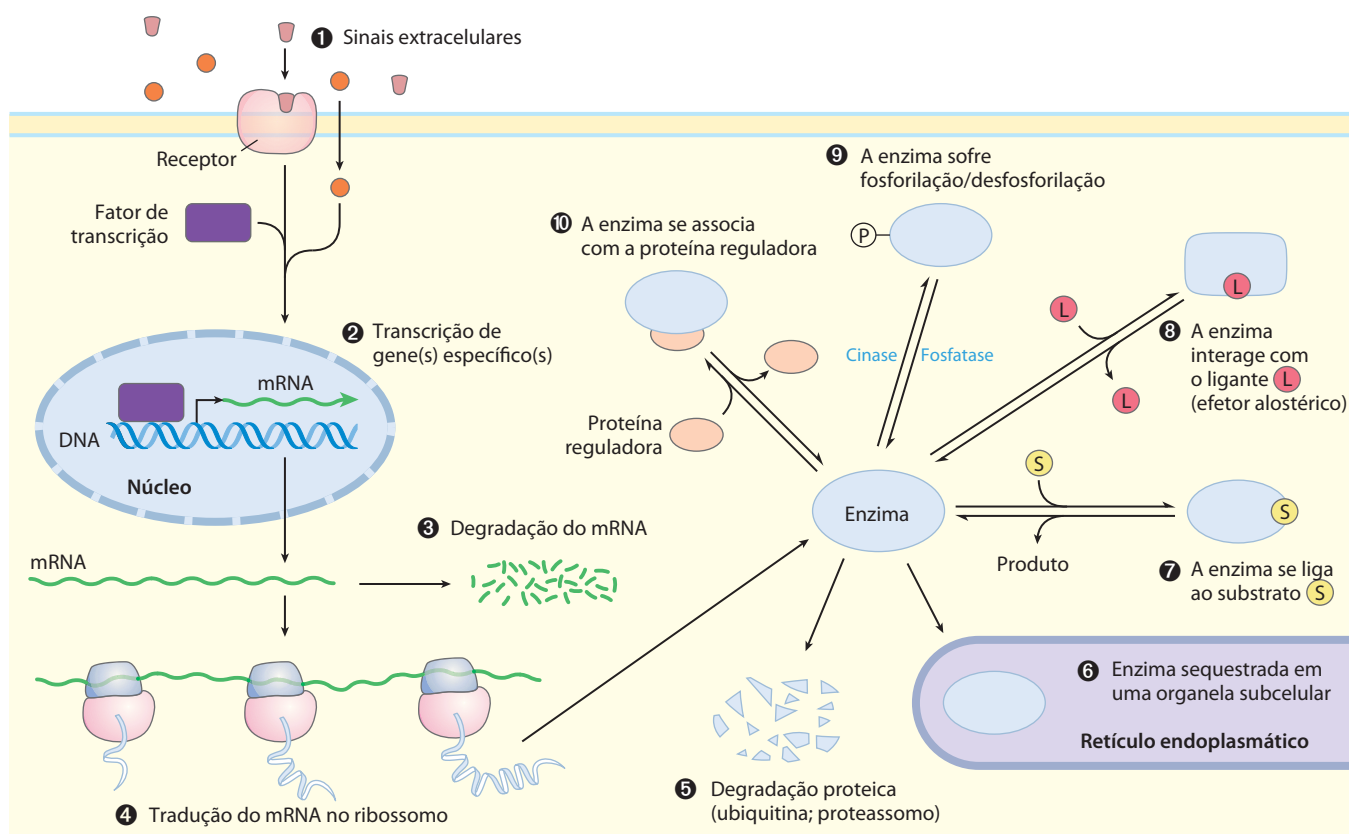



**FIGURA 15-2 Fatores que afetam a atividade das enzimas.** A atividade total de uma enzima pode ser mudada pela alteração do *número* de moléculas na célula, ou sua atividade *efetiva* em um compartimento subcelular (❶ a ❻), ou pela modulação da *atividade* de moléculas já existentes (❼ a ❿), conforme está detalhado no texto. Uma enzima pode ser influenciada por uma combinação destes fatores.

As moléculas proteicas, uma vez sintetizadas, têm um tempo de vida finito, que pode variar de alguns minutos até muitos dias (Tabela 15-1). A taxa de degradação proteica (Figura 15-2, ❺) difere de uma enzima para outra e depende das condições da célula. Algumas proteínas são marcadas pela ligação covalente de ubiquitina para serem degradadas nos proteassomos, conforme será discutido no Capítulo 27 (p. ex., o caso da ciclina, na Figura 12-47). A **reciclagem** rápida (síntese seguida de degradação) é energeticamente dispendiosa, mas proteínas com meia-vida curta podem alcançar novos níveis de estado estável muito mais rapidamente do que aquelas com meia-vida longa, e os benefícios dessa capacidade de resposta rápida devem equilibrar ou exceder o custo para a célula.

**TABELA 15-1** Meia-vida média das proteínas nos tecidos de mamíferos

| Tecido | Meia-vida (dias) |
|---|---|
| Fígado | 0,9 |
| Rim | 1,7 |
| Coração | 4,1 |
| Cérebro | 4,6 |
| Músculo | 10,7 |

Outra maneira de alterar a atividade *efetiva* de uma enzima é sequestrá-la e a seu substrato em compartimentos diferentes (Figura 15-2, ❻). No músculo, por exemplo, a hexocinase só pode agir sobre a glicose quando esta entra no miócito vinda do sangue, e a taxa de entrada depende da atividade dos transportadores de glicose (ver Tabela 11-3) na membrana plasmática. Dentro da célula, os compartimentos envoltos por membranas segregam determinadas enzimas e sistemas enzimáticos, e o fator limitante da ação enzimática será o transporte do substrato através dessas membranas intracelulares.

Por esses vários mecanismos de regulação do nível enzimático, as células podem alterar drasticamente a quantidade total de suas enzimas em resposta a mudanças nas condições metabólicas. Nos vertebrados, o fígado é o tecido mais adaptável; por exemplo, a mudança de uma dieta rica em carboidratos para uma rica em lipídeos afeta a transcrição de centenas de genes e consequentemente os níveis de centenas de proteínas. Essas alterações totais na expressão gênica podem ser quantificadas pelo uso de microarranjos de DNA (ver Figura 9-23), que revelam a quantidade total de mRNA presentes em certo tipo celular ou órgão (o **transcriptoma**), ou por eletroforese bidimensional (ver Figura 3-21), que mostra a totalidade de proteínas de um tipo celular ou de um órgão (seu **proteoma**). Ambas as técnicas proporcionam grande compreensão da regulação metabólica. O efeito das alterações no proteoma é com fre-

quência uma mudança no conjunto de metabólitos de baixa massa molecular, o **metaboloma** (**Figura 15-3**). O metaboloma de *E. coli* crescendo com glicose é dominado por poucas classes de metabólitos: glutamato (49%); nucleotídeos (principalmente ribonucleosídeos trifosfato) (15%); intermediários da glicólise, do ciclo do ácido cítrico e da via das pentoses-fosfato (vias centrais do metabolismo do carbono) (15%); e glutationas e fatores redox (9%).

Logo que os mecanismos reguladores que envolvem a síntese e a degradação de proteínas produzem um determinado número de moléculas de cada enzima na célula, a atividade dessas enzimas pode ser regulada ainda de várias outras maneiras: pela concentração do substrato, pela presença de efetores alostéricos, por modificações covalentes ou por ligação de proteínas reguladoras – por todas essas maneiras, a atividade de uma molécula de enzima pode ser alterada (Figura 15-2, ❼ a ❿).

Todas as enzimas são sensíveis à concentração de seu(s) substrato(s) (Figura 15-2, ❼). Recorde que, no caso mais simples (enzima que segue a cinética de Michaelis-Menten), a velocidade inicial da reação é a metade da velocidade máxima quando o substrato está presente em uma concentração igual ao $K_m$ (i.e., quando metade da enzima está saturada com o substrato). A atividade é reduzida com [S] mais baixa, e quando [S] $<<$ $K_m$ a velocidade da reação é linearmente dependente da [S].

Essa relação entre [S] e $K_m$ é importante porque as concentrações intracelulares do substrato estão frequentemente na mesma faixa do $K_m$ ou mais baixas. Por exemplo, a atividade de hexocinase se altera com a [glicose], e a concentração intracelular de glicose varia com sua concentração no sangue. Conforme será visto, as diferentes formas (isoenzimas) da hexocinase têm diferentes valores de $K_m$, sendo por isso afetadas de modo diferente por mudanças na concentração intracelular [de glicose], que fisiologicamente fazem sentido. Para muitas transferências de grupos fosforil do ATP e para as reações redox que usam NADPH ou $NAD^+$, a concentração do metabólito está bem acima do $K_m$ (**Figura 15-4**); esses cofatores não parecem ser o fator limitante em tais reações.

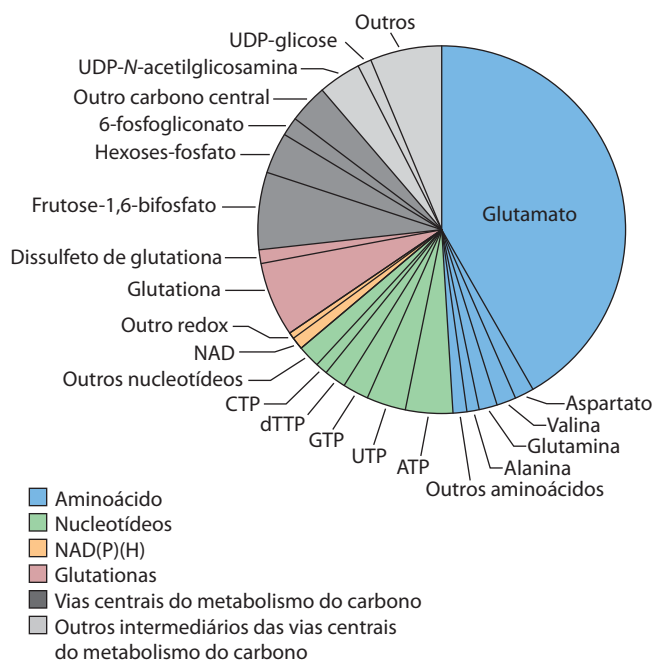



**FIGURA 15-3 O metaboloma da *E.coli* crescendo em glicose.** Resumo das quantidades dos 103 metabólitos medidas por uma combinaçãp de cromatografia líquida e espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS).

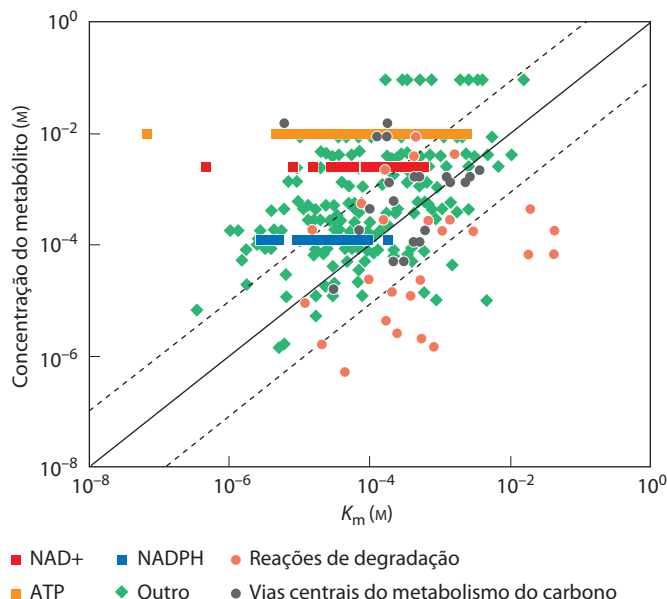



**FIGURA 15-4 Comparação entre o $K_m$ e a concentração do substrato de algumas enzimas metabólicas.** As concentrações dos metabólitos medidas na *E.coli* crescendo em glicose estão colocados no gráfico contra os $K_m$ conhecidos das enzimas que consomem estes metabólitos. A linha sólida é a da unidade (na qual a concentração do metabólito = $K_m$) e as linhas tracejadas correspondem a um desvio de dez vezes da linha da unidade.

**PROBLEMA RESOLVIDO 15-1** **Atividade de um transportador de glicose**

Se $K_t$ (o equivalente ao $K_m$) para o transportador da glicose no fígado (GLUT2) for 40 mM, calcule o efeito do aumento da concentração da glicose sanguínea de 3 mM para 10 mM na velocidade do seu fluxo para o hepatócito.

**Solução:** Utiliza-se a Equação 11-1 (p. 406) para calcular a velocidade inicial (fluxo) da captação da glicose.

$$V_0 = \frac{V_{máx}[S]_{fora}}{K_t + [S]_{fora}}$$

Em 3 mM de glicose

$$V_0 = V_{máx}\ (3\ \text{mM})/(40\ \text{mM} + 3\ \text{mM}) = V_{máx}\ (3\ \text{mM}/43\ \text{mM}) = 0{,}07\ V_{máx}$$

Em 10 mM de glicose

$$V_0 = V_{máx}\ (10\ \text{mM})/(40\ \text{mM} + 10\ \text{mM}) = V_{máx}\ (10\ \text{mM}/50\ \text{mM}) = 0{,}20\ V_{máx}$$

Assim, uma elevação da glicose sanguínea de 3 mM para 10 mM aumenta a taxa de influxo do açúcar em um hepatócito por um fator de 0,20/0,07 ≈ 3.

A atividade enzimática pode ser tanto aumentada como reduzida por um efetor alostérico (Figura 15-2, ❽; ver Figura 6-34). Os efetores alostéricos convertem cinéticas hiperbólicas em sigmoides, ou vice-versa (p. ex., ver Figura 15-16b). Na parte mais íngreme da curva sigmoide, uma pequena alteração na concentração do substrato, ou do efetor alostérico, pode ter um grande impacto na velocidade da reação. Recorde do Capítulo 5 (p. 167) que a cooperatividade de uma enzima alostérica pode ser expressa como um coeficiente de Hill, com coeficientes mais altos significando maior cooperatividade. Para uma enzima alostérica com coeficiente de Hill de 4, a atividade aumenta de 10% para 90% da $V_{máx}$ com apenas 3 vezes de aumento da [S], comparado com o aumento de 81 vezes na [S] necessário para uma enzima sem os efeitos cooperativos (coeficiente de Hill de 1; Tabela 15-2).

As modificações covalentes das enzimas ou de outras proteínas (Figura 15-2, ❾) ocorrem em segundos ou minutos após um sinal regulador extracelular. As modificações mais comuns são fosforilação e desfosforilação (**Figura 15-5**); a metade das proteínas de uma célula eucariótica é fosforilada em alguma situação. A fosforilação por uma proteína-cinase específica pode afetar as características eletrostáticas do sítio ativo da enzima, provocando o deslocamento de uma região inibidora da enzima para fora do sítio ativo, alterando a interação da enzima com outras proteínas, ou forçar mudanças conformacionais que se traduzem em alterações na $V_{máx}$ ou no $K_m$. Para que as modificações covalentes sejam úteis na regulação, a célula deve ser capaz de fazer a enzima alterada retornar ao seu estado original de atividade. A família das fosfoproteína-fosfatases, que estão, pelo menos algumas delas, sob regulação, catalisa a desfosforilação das proteínas.

Finalmente, muitas enzimas são reguladas pela associação e dissociação de outra proteína reguladora (Figura 15-2, ❿). Por exemplo, a proteína-cinase A dependente de AMP cíclico (PKA; ver Figura 12-6) é inativa até que a ligação com o cAMP separe a subunidade reguladora (inibidora) da catalítica da enzima.

Esses vários mecanismos que alteram o fluxo por uma etapa de uma via metabólica não são mutuamente exclusivos. É muito comum que uma enzima isolada seja regulada no nível de transcrição e também por mecanismos alostéricos e covalentes. As combinações proporcionam regulação rápida, fácil e eficaz em resposta a uma ampla gama de perturbações e sinais.

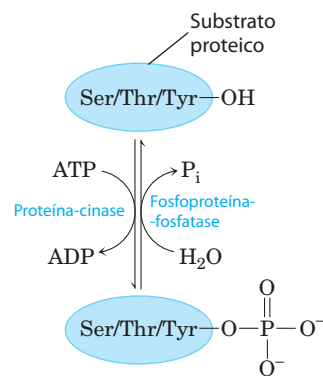



**FIGURA 15-5 Fosforilação e desfosforilação de proteínas.** As proteína-cinases transferem um grupo fosforil do ATP para resíduos de Ser, Thr ou Tyr em uma enzima ou outro substrato proteico. As proteína-fosfatases removem o grupo fosforil como $P_i$.

Nas discussões que seguem, é útil pensar em mudanças na atividade enzimática servindo a dois papéis distintos, mas complementares. Usa-se o termo **regulação metabólica** para abranger processos que servem para manter a homeostasia no nível molecular – para manter algum parâmetro celular (p. ex., concentração de um metabólito) em estado de equilíbrio ao longo do tempo, mesmo que o fluxo dos metabólitos se altere ao longo da via. O termo **controle metabólico** se refere a um processo que conduz a uma alteração no resultado de uma via metabólica ao longo do tempo, em resposta a um sinal externo ou uma mudança nas condições. A distinção, embora útil, nem sempre é fácil de ser feita.

## As reações longe do equilíbrio são pontos de regulação usuais nas células

Para algumas etapas de uma via metabólica, a reação está próxima do equilíbrio, com a célula no seu estado estável dinâmico (**Figura 15-6**). O fluxo líquido de metabólitos

**TABELA 15-2 Relação entre o coeficiente de Hill e o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da reação de enzimas alostéricas**

| Coeficiente de Hill ($n_H$) | Mudança requerida na [S] para aumentar a $V_0$ de 10% para 99% da $V_{máx}$ |
|---|---|
| 0,5 | × 6.600 |
| 1,0 | × 81 |
| 2,0 | × 9 |
| 3,0 | × 4,3 |
| 4,0 | × 3 |

❶ ❷ ❸

→ A ⇄ B ⇄ C ⇄ D

❶: $V$ = 10,01 (direta); $V$ = 0,01 (reversa)
❷: $V$ = 200 (direta); $V$ = 190 (reversa)
❸: $V$ = 500 (direta); $V$ = 490 (reversa)

Velocidade líquida: 10 10 10

**FIGURA 15-6 Etapas fora do equilíbrio e próximas do equilíbrio em uma via metabólica.** As etapas ❷ e ❸ desta via estão próximas do equilíbrio na célula; para cada etapa, a velocidade ($V$) da reação para a frente é levemente maior do que a velocidade da reação reversa, de modo que a velocidade líquida para a frente (10) é relativamente baixa e a variação de energia livre, $\Delta G$, é próxima de zero. Um aumento na [C] ou na [D] pode reverter a direção destas etapas. A etapa ❶ é mantida longe do equilíbrio na célula; sua velocidade para a frente é muito maior do que a da reação reversa. A velocidade líquida da etapa ❶ (10) é muito maior do que a da reação reversa (0,01) e é idêntica à velocidade líquida das etapas ❷ e ❸ quando a via está operando no estado de equilíbrio dinâmico. A etapa ❶ tem um $\Delta G$ negativo grande.

**TABELA 15-3** Constantes de equilíbrio, coeficientes de ação das massas e variações da energia livre das enzimas do metabolismo de carboidratos

| Enzima | $K'_{eq}$ | Razão da ação das massas, $Q$ | | Reação próxima do equilíbrio *in vivo*?* | $\Delta G'°$ (kJ/mol) | $\Delta G'$ (kJ/mol) no coração |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Fígado | Coração | | | |
| Hexocinase | $1 \times 10^{3}$ | $2 \times 10^{-2}$ | $8 \times 10^{-2}$ | Não | −17 | −27 |
| PFK-1 | $1{,}0 \times 10^{3}$ | $9 \times 10^{-2}$ | $3 \times 10^{-2}$ | Não | −14 | −23 |
| Aldolase | $1{,}0 \times 10^{-4}$ | $1{,}2 \times 10^{-6}$ | $9 \times 10^{-6}$ | Sim | +24 | −6,0 |
| Triose-fosfato-isomerase | $4 \times 10^{-2}$ | —[†] | $2{,}4 \times 10^{-1}$ | Sim | +7,5 | +3,8 |
| Gliceraldeído-3-fosfato--desidrogenase + fosfoglicerato-cinase | $2 \times 10^{3}$ | $6 \times 10^{2}$ | 9,0 | Sim | −13 | +3,5 |
| Fosfoglicerato-mutase | $1 \times 10^{-1}$ | $1 \times 10^{-1}$ | $1{,}2 \times 10^{-1}$ | Sim | +4,4 | +0,6 |
| Enolase | 3 | 2,9 | 1,4 | Sim | −3,2 | −0,5 |
| Piruvato-cinase | $2 \times 10^{4}$ | $7 \times 10^{-1}$ | 40 | Não | −31 | −17 |
| Fosfoglicose-isomerase | $4 \times 10^{-1}$ | $3{,}1 \times 10^{-1}$ | $2{,}4 \times 10^{-1}$ | Sim | +2,2 | −1,4 |
| Piruvato-carboxilase + PEP-carboxicinase | 7 | $1 \times 10^{-3}$ | —[†] | Não | −5,0 | −23 |
| Glicose-6-fosfatase | $8{,}5 \times 10^{2}$ | $1{,}2 \times 10^{2}$ | —[†] | Sim | −17 | −5,0 |

**Fonte:** $K'_{eq}$ e $Q$ de Newsholme, E.A. e Start, C. (1973) *Regulation in Metabolism*, Wiley Press, New York, p. 97, 263. $\Delta G$ e $\Delta G'°$ foram calculados a partir destes dados.
*Para simplificar, qualquer reação na qual o valor absoluto do $\Delta G$ calculado seja menor do que 6 é considerada próxima do equilíbrio.
[†]Dados não disponíveis.

nessas etapas é a pequena diferença entre a velocidade da reação direta e da reação inversa, velocidades muito similares quando a reação está próxima do equilíbrio. Pequenas alterações nas concentrações do substrato ou do produto podem produzir grande alteração na taxa líquida, podendo mesmo mudar a direção do fluxo líquido. É possível identificar essas reações próximas do equilíbrio em uma célula comparando a **razão da ação das massas**, $\boldsymbol{Q}$, com a constante de equilíbrio para a reação, $K'_{eq}$. Recorde que, na reação A + B → C + D, $Q = [C][D]/[A][B]$. Quando $Q$ e $K'_{eq}$ estiverem dentro de 1 a 2 ordens de grandeza entre si, a reação está próxima do equilíbrio. Esse é o caso em 6 das 10 etapas da via glicolítica (Tabela 15-3).

Outras reações na célula estão longe do equilíbrio. Por exemplo, $K'_{eq}$ para a reação da fosfofrutocinase-1 (PFK-1) é de cerca de 1.000, mas $Q$ ([frutose-1,6-bifosfato][ADP]/[frutose-6-fosfato][ATP]) em um hepatócito no estado estável é de cerca de 0,1 (Tabela 15-3). Isto é, a reação está tão longe do equilíbrio que o processo é exergônico sob condições celulares e tende a ir adiante. A reação é mantida longe do equilíbrio porque, sob condições correntes de concentrações de substrato, de produto e de efetor, a taxa de conversão da frutose-6-fosfato a frutose-1,6-bifosfato está limitada pela atividade da PFK-1, ela própria limitada pelo número de moléculas de PFK-1 presentes e pela ação dos efetores alostéricos. Assim, a taxa líquida da reação direta catalisada pela enzima é igual ao fluxo líquido dos intermediários glicolíticos por outras etapas da via, e o fluxo inverso pela PFK-1 permanece próximo de zero.

A célula *não pode* permitir reações com grandes constantes de equilíbrio para alcançar o equilíbrio. Se [frutose-6--fosfato], [ATP] e [ADP] na célula forem mantidas em níveis típicos (concentrações milimolares baixas) e for permitido à reação da PFK-1 alcançar o equilíbrio por uma elevação na [frutose-1,6-bifosfato], a concentração desse produto se elevará para a faixa molar causando destruição osmótica da célula. Considere outro caso: se fosse permitido à reação ATP → ADP + $P_i$ se aproximar do equilíbrio, a variação real de energia livre ($\Delta G'$) para essa reação ($\Delta G_p$, ver Problema Resolvido 13-2, p. 519) se aproximaria de zero, e o ATP perderia o potencial de transferência do grupo fosforil de alta energia, que é valioso para a célula. Por isso é essencial que as enzimas que catalisam a degradação do ATP e outras reações altamente exergônicas sejam sensíveis à regulação, de forma que, quando as mudanças metabólicas forem forçadas por condições externas, o fluxo por essas enzimas seja ajustado para assegurar que a [ATP] permaneça muito acima do seu nível de equilíbrio. Quando tais mudanças metabólicas ocorrem, as atividades das enzimas em todas as vias interconectadas se ajustam para manter as etapas críticas longe do equilíbrio. Assim, não é surpreendente que muitas enzimas (como a PFK-1) que catalisam reações altamente exergônicas estejam sujeitas a uma grande variedade de mecanismos reguladores refinados. A multiplicidade desses ajustes é tão grande que é impossível prever só pelo exame das propriedades de uma enzima qualquer em uma via se essa enzima tem uma grande influência no fluxo líquido por toda a via. Esse problema complexo pode ser abordado pela análise do controle metabólico, conforme descrito na Seção 15.2.

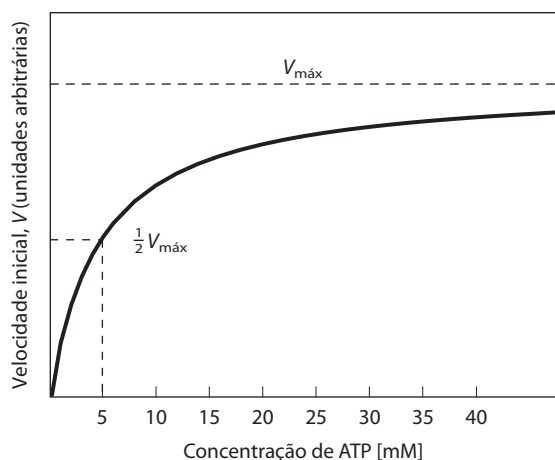



**FIGURA 15-7 Efeito da concentração de ATP na velocidade inicial da reação de uma enzima dependente de ATP típica.** Estes dados experimentais produzem um $K_m$ de 5 mM para o ATP. A concentração de ATP nos tecidos animais é de aproximadamente 5 mM.

## Os nucleotídeos de adenina têm papéis especiais na regulação metabólica

Talvez nada seja mais importante para uma célula, após a proteção de seu DNA contra danos, do que a manutenção de um suprimento e de uma concentração de ATP constantes. Muitas enzimas que utilizam ATP têm valores de $K_m$ entre 0,1 e 1 mM, sendo que a concentração de ATP em uma célula típica é de 5 a 10 mM (Figura 15-4). Se a [ATP] diminuir significativamente, essas enzimas não estarão totalmente saturadas pelo seu substrato (ATP), e a velocidade de centenas de reações que envolvem ATP seria reduzida (**Figura 15-7**); a célula provavelmente não sobreviveria a esse efeito *cinético* sobre tantas reações.

Existe também um efeito *termodinâmico* importante na redução da [ATP]. Uma vez que o ATP é convertido em ADP ou AMP quando é "gasto" para realizar trabalho celular, a relação [ATP]/[ADP] afeta profundamente todas as reações que utilizam estes cofatores. (O mesmo é verdadeiro para outros cofatores importantes como $NADH/NAD^+$ e $NADPH/NADP^+$.) Considere, por exemplo, a reação catalisada pela hexocinase:

$$\text{ATP} + \text{glicose} \longrightarrow \text{ADP} + \text{glicose-6-fosfato}$$

$$K'_{eq} = \frac{[\text{ADP}]_{eq}[\text{glicose-6-fosfato}]_{eq}}{[\text{ATP}]_{eq}[\text{glicose}]_{eq}} = 2 \times 10^3$$

Observe que esta expressão *somente* é verdadeira quando os reagentes e os produtos estiverem nas suas concentrações de *equilíbrio* quando $\Delta G' = 0$. Em qualquer outra combinação de concentrações, $\Delta G'$ não é zero. Recorde (do Capítulo 13) que a razão dos produtos e substratos (a razão da ação das massas, $Q$) determina a magnitude e o sinal de $\Delta G'$ e por isso a força motriz, $\Delta G'$, da reação:

$$\Delta G' = \Delta G'^{\circ} + RT \ln \frac{[\text{ADP}][\text{glicose 6-fosfato}]}{[\text{ATP}][\text{glicose}]}$$

Uma vez que uma alteração nessa força motriz influencia profundamente cada reação que envolve ATP, os organismos evoluíram sob intensa pressão para desenvolver mecanismos reguladores que respondam à razão [ATP]/[ADP].

A concentração de AMP é um indicador ainda mais sensível do estado energético da célula do que a [ATP]. As células normalmente têm uma concentração muito mais alta de ATP (5 a 10 mM) do que de AMP ($<$ 0,1 mM). Quando alguns processos (p. ex., contração muscular) consomem ATP, o AMP é produzido em duas etapas. Primeiro a hidrólise do ATP produz ADP, e depois a reação catalisada pela **adenilato-cinase** produz AMP:

$$2\text{ADP} \longrightarrow \text{AMP} + \text{ATP}$$

Se o ATP for consumido de forma que sua concentração diminua 10%, o aumento *relativo* na [AMP] é muito maior do que na [ADP] (Tabela 15-4). Por isso não é surpreendente que muitos processos reguladores sejam comandados por alterações na [AMP]. O mediador mais importante da regulação por AMP provavelmente seja a **proteína-cinase ativada por AMP** (**AMPK**), que responde a um aumento na [AMP] pela fosforilação de enzimas-chave, regulando assim suas atividades. A elevação da [AMP] pode ser causada por um suprimento reduzido de nutrientes ou pelo aumento do exercício. A ação da AMPK (não confundir com a proteína-cinase dependente de AMP *cíclico*; ver Seção 15.5) aumenta o transporte de glicose e ativa a glicólise e a oxidação dos ácidos graxos, enquanto suprime os processos que requerem energia, como a síntese de ácidos graxos, colesterol e proteínas (**Figura 15-8**). A AMPK é discutida adiante, e os mecanismos detalhados pelos quais ela realiza essas mudanças serão analisados no Capítulo 23.

Centenas de intermediários metabólicos, além do ATP, devem estar presentes na célula em concentrações apropriadas. Para tomar somente um exemplo: os intermediários glicolíticos di-hidroxiacetona-fosfato e 3-fosfoglicerato são, respectivamente, precursores de triacilgliceróis e serina. Quando esses produtos são necessários, a taxa de glicólise deve se

**TABELA 15-4** Variações relativas na [ATP] e na [AMP] quando o ATP é consumido

| Nucleotídeo de adenina | Concentração antes da depleção de ATP (mM) | Concentração após a depleção de ATP (mM) | Variação relativa |
|---|---|---|---|
| ATP | 5,0 | 4,5 | 10% |
| ADP | 1,0 | 1,0 | 0 |
| AMP | 0,1 | 0,6 | 600% |

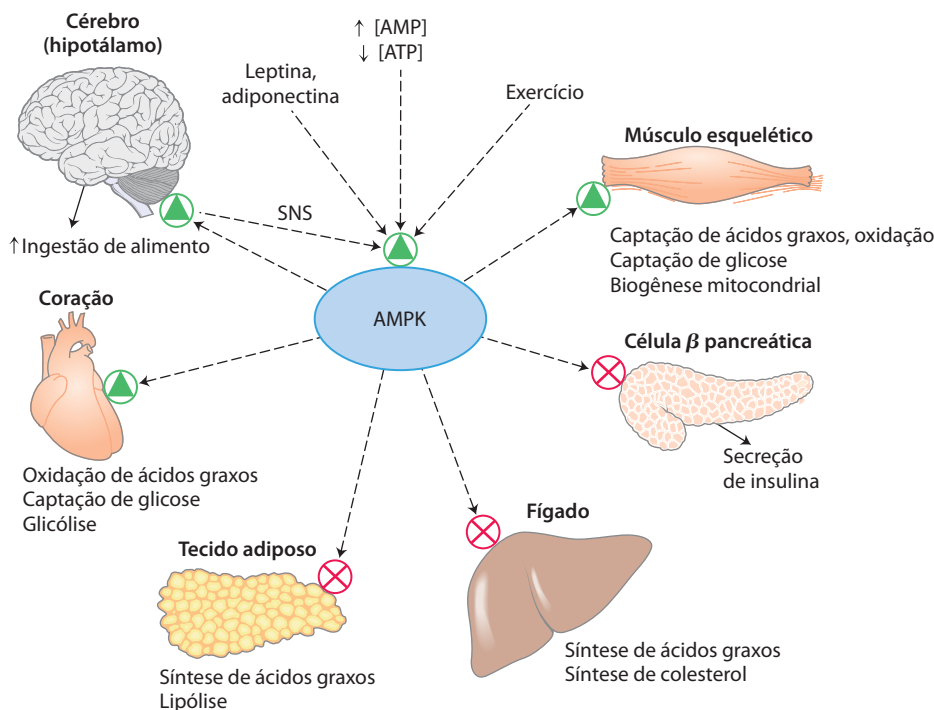



**FIGURA 15-8 Papel da proteína-cinase ativada por AMP (AMPK) no metabolismo de carboidratos e de gorduras.** A AMPK é ativada por [AMP] elevada ou por [ATP] reduzida, pelo exercício, pelo sistema nervoso simpático (SNS), ou por hormônios peptídicos produzidos no tecido adiposo (leptina e adiponectina, descritos em mais detalhe no Capítulo 23). A AMPK, quando ativada, fosforila proteínas-alvo e altera o metabolismo de uma grande variedade de tecidos, distanciando-o dos processos que consomem energia como a síntese de glicogênio, de ácidos graxos e de colesterol; altera o metabolismo nos tecidos extra-hepáticos para o uso de ácidos graxos como combustível; e desencadeia a gliconeogênese no fígado para fornecer glicose para o cérebro. No hipotálamo, a AMPK estimula o comportamento de alimentação para fornecer mais combustível com a dieta.

ajustar para fornecê-los sem reduzir a produção glicolítica de ATP. Isso também ocorre na manutenção dos níveis de outros cofatores importantes, como NADH e NADPH: mudanças na sua razão da ação das massas (isto é, na relação entre cofator reduzido e oxidado) têm efeitos sobre o metabolismo.

As prioridades no nível do *organismo*, é claro, também impulsionaram a evolução dos mecanismos reguladores. O cérebro dos animais quase não possui estoques de fontes de energia, dependendo de um suprimento constante de glicose do sangue. Se a glicose sanguínea diminuir da sua concentração normal de 4 a 5 mM para a metade desse nível, o resultado é confusão mental, e uma redução de cinco vezes pode levar ao coma e à morte. Para proteger contra mudanças na concentração sanguínea de glicose, a liberação dos hormônios insulina e glucagon, provocada pela glicose sanguínea alta ou baixa, respectivamente, causa mudanças metabólicas que tendem a fazer a concentração sanguínea da glicose voltar ao normal.

Outras pressões seletivas devem ter agido ao longo da evolução, selecionando mecanismos reguladores que cumprem o que segue:

1. Maximizar a eficiência da utilização dos combustíveis por impedir o funcionamento simultâneo de vias em direções opostas (como glicólise e gliconeogênese).
2. Separar os metabólitos apropriadamente em vias alternativas (como a glicólise e a via das pentoses-fosfato).
3. Mobilizar o combustível mais adequado para as necessidades imediatas do organismo (glicose, ácidos graxos, glicogênio ou aminoácidos).
4. Reduzir vias biossintéticas quando seus produtos se acumulam.

Os capítulos remanescentes deste livro apresentam muitos exemplos de cada um dos tipos de mecanismos reguladores.

## RESUMO 15.1 Regulação das vias metabólicas

- Em uma célula metabolicamente ativa no estado estável, os intermediários são formados e utilizados em taxas iguais. Quando uma perturbação transitória altera a taxa de formação ou de utilização de um metabólito, alterações compensatórias nas atividades das enzimas reconduzem o sistema ao estado estável.
- As células regulam seu metabolismo por meio de uma grande variedade de mecanismos em uma escala de tempo que varia de menos de um milissegundo até dias, tanto pela mudança na atividade de moléculas enzimáticas preexistentes quanto pela mudança no número de moléculas de uma enzima específica.
- Vários sinais ativam ou inativam fatores de transcrição, que atuam no núcleo e regulam a expressão gênica. Mudanças no transcriptoma levam a mudanças no proteoma e, por fim, no metaboloma de uma célula ou tecido.

- Nos processos com múltiplas etapas como a glicólise, determinadas reações estão em equilíbrio no estado estável; as velocidades dessas reações aumentam e diminuem com a concentração do substrato. Outras reações estão fora do equilíbrio; essas etapas são os pontos de regulação global da via.
- Os mecanismos reguladores mantêm níveis praticamente constantes de metabólitos-chave como ATP e NADH nas células e de glicose no sangue, enquanto adaptam o uso ou a produção de glicose às necessidades variáveis do organismo.
- Os níveis de ATP e de AMP são um reflexo sensível do estado energético da célula, e quando a razão [ATP]/[AMP] diminui, a proteína-cinase ativada por AMP (AMPK) desencadeia uma grande variedade de respostas celulares para elevar a [ATP] e reduzir a [AMP].

## 15.2 Análise do controle metabólico

Eduard Buchner, 1860–1917

Estudos detalhados da regulação metabólica só se tornaram possíveis depois da elucidação das etapas químicas básicas das vias e da caracterização das enzimas responsáveis. Tendo como ponto de partida a descoberta de Eduard Buchner (por volta de 1900) de que um extrato de células de levedura poderia converter glicose em etanol e $CO_2$, o impulso principal da pesquisa bioquímica foi decifrar as etapas pelas quais essa transformação ocorria e purificar e caracterizar as enzimas que catalisavam cada etapa. Na metade do século XX, todas as 10 enzimas da via glicolítica estavam purificadas e caracterizadas. Nos 50 anos seguintes se aprendeu muito sobre a regulação destas enzimas, por sinais extra e intracelulares, por meio dos mecanismos covalentes e alostéricos descritos neste capítulo. O critério convencional era que, em uma via linear como a glicólise, a catálise por uma das enzimas deveria ser a mais lenta, determinando, desse modo, a velocidade do fluxo metabólico por toda a via. No caso da glicólise, a PFK-1 foi considerada a enzima de velocidade limitante, porque se sabe que é regulada pela frutose-1,6-bifosfatase e outros efetores alostéricos.

Com o advento da tecnologia da engenharia genética, se tornou possível testar essa hipótese da "única etapa determinante da velocidade" pelo aumento da concentração da enzima que catalisa a "etapa limitante da velocidade" em uma via e pela determinação do aumento proporcional do fluxo ao longo da via. Com frequência não aumenta; a solução simples (uma única etapa determinante da velocidade) está errada. Atualmente está claro que, na maioria das vias, o controle do fluxo é distribuído entre várias enzimas, e o grau com que cada uma contribui para o controle varia com as condições metabólicas – o suprimento do material de partida (p. ex., glicose), o suprimento de oxigênio, a necessidade de outros produtos derivados de intermediários da via (como a glicose-6-fosfato para a via das pentoses-fosfato em células que sintetizam grande quantidade de nucleotídeos), os efeitos dos metabólitos com funções reguladoras, e o estado hormonal do organismo (os níveis de insulina e glucagon), entre outros fatores.

Por que o interesse nos fatores que limitam o fluxo por uma via? Para entender a ação dos hormônios ou de fármacos, ou a patologia que resulta de uma falha na regulação metabólica, é preciso saber onde é exercido o controle. Se os pesquisadores desejam desenvolver um fármaco que estimule ou iniba uma via, o alvo lógico é a enzima que tenha o maior impacto no fluxo por esta via. A bioengenharia de um microrganismo para produzir uma grande quantidade de um produto de valor comercial (p. 321) requer um conhecimento do que limita o fluxo de metabólitos para este produto.

### A contribuição de cada enzima para o fluxo através de uma via é determinada experimentalmente

Existem várias maneiras de determinar experimentalmente como uma variação na atividade de uma enzima em uma via afeta o fluxo metabólico por essa via. Considere os resultados experimentais mostrados na **Figura 15-9**. Quando uma amostra de fígado de rato foi homogeneizada para liberar todas as enzimas solúveis, o extrato realizou a conversão glicolítica da glicose em frutose-1,6-bifosfato a uma velocidade mensurável. (Para simplificar, esse experimento está focado somente na primeira parte da via glicolítica.) Quando foram adicionadas ao extrato quanti-

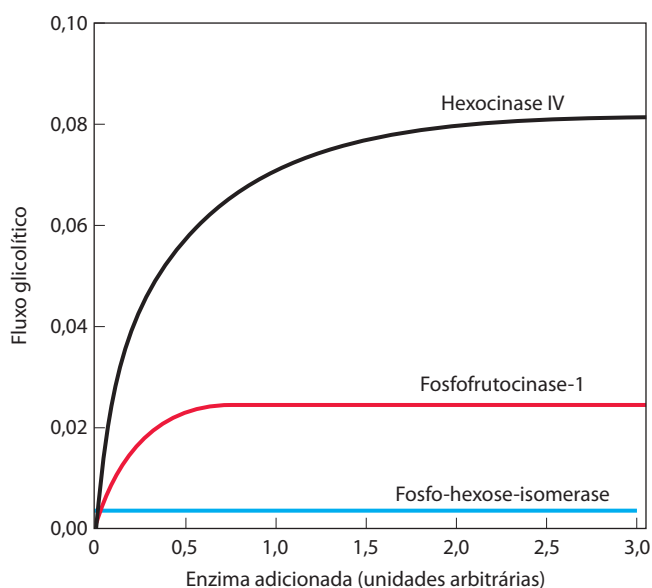



**FIGURA 15-9 Dependência do fluxo glicolítico sobre enzimas adicionadas, em um homogeneizado de fígado de rato.** Enzimas purificadas, nas quantidades mostradas no eixo do *x*, foram adicionadas a um extrato de fígado realizando glicólise. O aumento no fluxo ao longo da via é mostrado no eixo do *y*.

dades crescentes de hexocinase IV (glicocinase) purificada, a velocidade da glicólise aumentou gradualmente. A adição de PFK-1 purificada também aumentou a velocidade da glicólise, mas não tão dramaticamente quanto a hexocinase. A adição de fosfo-hexose-isomerase purificada não teve efeito. Esses resultados sugerem que ambas, a hexocinase e a PFK-1, contribuem para determinar o fluxo pela via (hexocinase mais do que PFK-1), e que a fosfo-hexose-isomerase não.

Experimentos semelhantes podem ser feitos em células intactas ou em organismos, usando inibidores ou ativadores específicos para alterar a atividade de uma enzima e observar ao mesmo tempo o efeito sobre o fluxo pela via. A quantidade de uma enzima também pode ser alterada geneticamente; a bioengenharia pode produzir uma célula que faça cópias extras da enzima em estudo ou ter uma versão da enzima menos ativa do que a enzima normal. O aumento genético da concentração de uma enzima às vezes causa efeitos significativos no fluxo e às vezes não tem efeito.

Três parâmetros críticos, que juntos descrevem a capacidade de resposta de uma via a mudanças nas condições metabólicas, estão no centro da **análise do controle metabólico**. Agora será feita uma descrição qualitativa desses parâmetros e de seu significado no contexto de uma célula viva. O Quadro 15-1 fornece uma descrição quantitativa mais rigorosa.

## O coeficiente de controle de fluxo quantifica o efeito de uma alteração na atividade enzimática sobre o fluxo metabólico por uma via

Dados quantitativos sobre fluxo metabólico, obtidos conforme a descrição da Figura 15-9, podem ser usados para calcular um **coeficiente de controle de fluxo**, $\boldsymbol{C}$, para cada uma das enzimas de uma via. Esse coeficiente expressa a contribuição relativa de cada enzima na determinação da velocidade na qual os metabólitos fluem pela via – isto é, o **fluxo**, $\boldsymbol{J}$. $C$ pode ter qualquer valor de 0,0 (para enzimas sem impacto sobre o fluxo) a 1,0 (para enzimas que determinam totalmente o fluxo). Uma enzima também pode ter um coeficiente *negativo* de controle de fluxo. Em uma via ramificada, uma enzima em um ramo, pelo fato de remover intermediários de outro ramo, pode ter um impacto negativo sobre o fluxo por esse outro ramo (**Figura 15-10**). $C$ não é uma constante, não sendo intrínseco a uma única enzima; é uma função de todo o sistema de enzimas, e seu valor depende da concentração dos substratos e dos efetores.

Quando dados reais de experimentos de glicólise em extratos de fígado de rato (Figura 15-9) foram submetidos a esse tipo de análise, os pesquisadores constataram coeficientes de controle de fluxo (para as enzimas nas concentrações encontradas no extrato) de 0,79 para a hexocinase, 0,21 para a PFK-1, e 0,0 para a fosfo-hexose-isomerase. Não é por acaso que esses valores somam 1,0; é possível mostrar que, para qualquer via completa, a soma dos coeficientes de controle de fluxo deve ser igual à unidade.

E
$C_4 = -0{,}2$
A ⇌ B ⇌ C ⇌ D
$C_1 = 0{,}3$ $C_2 = 0{,}0$ $C_3 = 0{,}9$

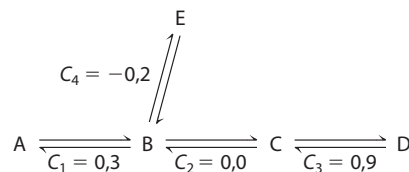



**FIGURA 15-10 O coeficiente de controle de fluxo, *C*, em uma via metabólica ramificada.** Nesta via simples, o intermediário B tem dois destinos alternativos. À medida que a reação B → E remove B da via A → D, ela controla esta via, o que resulta em um coeficiente de controle de fluxo para a enzima que catalisa a etapa B → E. Observe que a soma dos quatro coeficientes é igual a 1,0, como deve ser para qualquer sistema de enzimas definido.

## O coeficiente de elasticidade está relacionado com a capacidade de resposta da enzima a alterações na concentração do metabólito ou do regulador

Um segundo parâmetro, o **coeficiente de elasticidade**, $\boldsymbol{\varepsilon}$, expressa quantitativamente a capacidade de resposta de uma única enzima a alterações na concentração de um metabólito ou de um regulador; é função das propriedades cinéticas intrínsecas da enzima. Por exemplo, uma enzima com típica cinética de Michaelis-Menten mostra uma resposta hiperbólica ao aumento da concentração do substrato (**Figura 15-11**). Em baixas concentrações do substrato (p. ex., $K_m$ 0,1), cada incremento na concentração do substrato resulta em um aumento comparável na atividade enzimática, produzindo um $\varepsilon$ próximo de 1,0. Em concentrações de substrato relativamente altas (p. ex., $K_m$ 10), o aumento da concentração do substrato tem efeito pequeno sobre a velocidade da reação, porque a enzima já está saturada com o substrato. A elasticidade nesse caso se aproxima de zero. Para enzimas alostéricas que apresentam cooperatividade positiva, $\varepsilon$ pode exceder 1,0, mas não excede o coeficiente de Hill, que está entre 1,0 e 4,0.

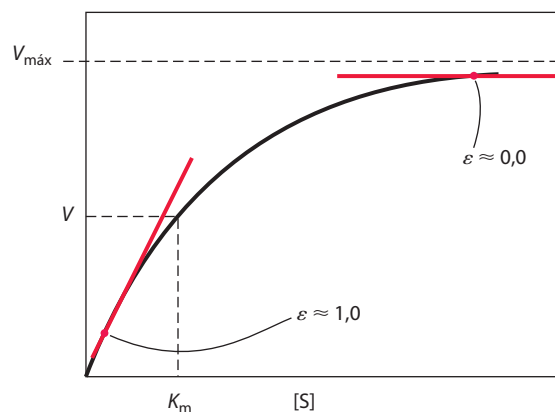



**FIGURA 15-11 Coeficiente de elasticidade, $\varepsilon$, de uma enzima com a cinética de Michaelis-Menten.** Em concentrações do substrato bem abaixo do $K_m$, cada aumento na [S] produz um grande aumento correspondente na velocidade da reação, $V$. Nesta região da curva, a enzima tem um $\varepsilon$ de 1,0. Em [S] >> $K_m$, o aumento da [S] tem pequeno efeito sobre a $V$; neste caso, $\varepsilon$ está próximo de zero.

**QUADRO 15-1 MÉTODOS Análise do controle metabólico: aspectos quantitativos**

Os fatores que influenciam a circulação dos intermediários (fluxo) ao longo de uma via podem ser determinados quantitativamente de modo experimental, sendo expressos em termos úteis para a predição da alteração no fluxo quando ocorrer alteração de algum fator envolvido na via. Considere a sequência de reações simples na Figura Q-1, na qual um substrato X (p. ex., glicose) é convertido, em várias etapas, em um produto Z (talvez piruvato, formado na glicólise). Uma das enzimas tardias na rota é uma desidrogenase (ydh) que atua sobre o substrato Y. Uma vez que a atividade da desidrogenase é facilmente medida (ver Figura 13-24), é possível usar o fluxo ($J$) por essa etapa ($J_{ydh}$) para medir o fluxo ao longo de toda a via. Manipula-se experimentalmente o nível de uma enzima inicial na via (xase, que atua sobre o substrato X) e mede-se o fluxo ao longo da via ($J_{ydh}$) para vários níveis da enzima xase.

X —xase ($J_{xase}$)→ $S_1$ —multietapa→ Y —ydh ($J_{ydh}$)→ $S_6$ —multietapa→ Z

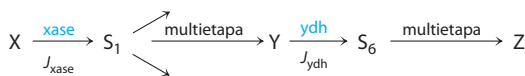



**FIGURA Q-1** Fluxo ao longo de uma via multienzimática hipotética.

A relação entre o fluxo pela via de X a Z na célula intacta e a concentração de cada enzima da via deve ser hiperbólica, sem fluxo quando a atividade enzimática for infinitamente baixa e com fluxo próximo ao máximo quando a atividade enzimática for muito alta. Em uma curva de $J_{ydh}$ contra a concentração da xase, $E_{xase}$, a mudança no fluxo com uma pequena alteração no nível da enzima é $\partial J_{ydh}/\partial E_{xase}$, que é simplesmente a inclinação da tangente da curva em qualquer concentração da enzima $E_{xase}$, e que tende a zero na $E_{xase}$ saturante. Em baixa $E_{xase}$, a inclinação é íngreme; o fluxo aumenta com cada incremento na atividade enzimática. Em $E_{xase}$ muito alta, a inclinação é muito menor; o sistema é menos responsivo à adição de xase porque ela já está presente em excesso em relação às outras enzimas da via.

Usa-se a relação $\partial J_{ydh}/\partial E_{xase}$ para mostrar quantitativamente a dependência do fluxo ao longo da via, $J_{ydh}$, sobre $E_{xase}$. No entanto, sua utilidade é limitada porque o seu valor depende das unidades usadas para expressar fluxo e atividade enzimática. Pela expressão das mudanças *fracionais* no fluxo e na atividade enzimática, $\partial J_{ydh}/J_{ydh}$ e $\partial E_{xase}/E_{xase}$, se obtém uma equação unificadora para o **coeficiente de controle de fluxo**, ***C***, neste caso $C^{J_{ydh}}_{xase}$:

$$C^{J_{ydh}}_{xase} \approx \frac{\partial J_{ydh}}{J_{ydh}} \Big/ \frac{\partial E_{xase}}{E_{xase}} \qquad (1)$$

Isto pode ser rearranjado para:

$$C^{J_{ydh}}_{xase} \approx \frac{\partial J_{ydh}}{\partial E_{xase}} \cdot \frac{E_{xase}}{J_{ydh}}$$

que é matematicamente idêntico a

$$C^{J_{ydh}}_{xase} \approx \frac{\partial \ln J_{ydh}}{\partial \ln E_{xase}}$$

Esta equação sugere um meio gráfico simples de determinar o coeficiente de controle de fluxo: $C^{J_{ydh}}_{xase}$ é a inclinação da tangente da curva de $J_{ydh}$ *versus* ln de $E_{xase}$, que pode ser obtido pela utilização dos dados experimentais da Figura Q-2a em outro gráfico para se obter a Figura Q-2b. Observe que $C^{J_{ydh}}_{xase}$ não é uma constante; ele depende da $E_{xase}$ inicial a partir da qual acontece a alteração no nível enzimático. Para os casos mostrados na Figura Q-2, $C^{J_{ydh}}_{xase}$ é de 1,0 na $E_{xase}$ mais baixa, mas somente cerca de 0,2 em alta $E_{xase}$. Um valor próximo de 1,0 para $C^{J_{ydh}}_{xase}$ significa que a concentração da enzima determina totalmente o fluxo pela via; um valor próximo de 0,0 significa que a concentração da enzima não limita o fluxo pela via. Alterações na atividade da enzima não terão forte efeito sobre o fluxo, a menos que o coeficiente de controle de fluxo seja maior do que 0,5.

A **elasticidade** ($\varepsilon$) de uma enzima é uma medida de como a atividade catalítica dessa enzima se altera com a alteração da concentração do metabólito – substrato, produto ou efetor. A medida é obtida a partir de uma curva experimental da velocidade da reação catalisada pela enzima *versus* a concentração do metabólito, nas concentrações prevalentes na célula. Usando argumentos análogos aos utilizados para deduzir $C$, é possível mostrar que $\varepsilon$ é a inclinação da tangente da curva de ln $V$ *versus* ln [substrato, produto ou efetor]:

## O coeficiente de resposta expressa o efeito de um controlador externo sobre o fluxo de uma via

Também é possível derivar uma expressão quantitativa para o impacto relativo de um fator externo (hormônio ou fator de crescimento), que não é nem metabólito nem uma enzima da via, sobre o fluxo pela via. O experimento mede o fluxo pela via (nesse caso, glicólise) em vários níveis do parâmetro $P$ (p. ex., concentração de insulina) para obter o **coeficiente de resposta**, ***R***, que expressa a alteração no fluxo quando $P$ ([insulina]) se altera.

Esses três coeficientes, $C$, $\varepsilon$ e $R$, estão relacionados de uma maneira simples: a capacidade de resposta ($R$) de uma via a um fator externo que afeta uma determinada enzima é uma função de (1) quão sensível é a via a mudanças na atividade desta enzima (o coeficiente de controle de fluxo, $C$) e (2) quão sensível é a enzima específica a mudanças no fator controlador externo (a elasticidade, $\varepsilon$):

$$R = C \cdot \varepsilon$$

Cada enzima da via pode ser examinada desta forma, e os efeitos de qualquer um de vários fatores externos sobre o fluxo na via podem ser determinados separadamente. As-

**FIGURA Q-2** Coeficiente de controle de fluxo. **(a)** Variação típica do trajeto do fluxo, $J_{ydh,}$ medido na etapa catalisada pela enzima ydh, como uma função da quantidade da enzima xase, $E_{xase}$, que catalisa uma etapa mais inicial na via. O coeficiente de controle de fluxo em (*e,j*) é a inclinação do produto da tangente da curva, $\partial J_{ydh}/\partial E_{xase}$, e a relação (fator de inclinação) *e/j*. **(b)** Em um gráfico de duplo logaritmo da mesma curva, o coeficiente de controle de fluxo é a inclinação da tangente da curva.

$$\varepsilon_S^{xase} = \frac{\partial V_{xase}}{\partial S} \cdot \frac{S}{V_{xase}} = \frac{\partial \ln |V_{xase}|}{\partial \ln S}$$

Para uma enzima com a cinética de Michaelis-Menten típica, o valor de $\varepsilon$ varia de 1 desde concentrações de substrato muito abaixo do $K_m$ a próximo de 0 quando se aproxima da $V_{máx}$. As enzimas alostéricas podem ter elasticidade maior que 1,0, mas não maior que seu coeficiente de Hill (p. 167).

Finalmente, o efeito dos controladores externos à própria via (isto é, não metabólitos) pode ser medido e expresso como o **coeficiente de resposta**, ***R***. A alteração no fluxo ao longo da via é medida por mudanças na concentração do parâmetro controlador, $P$, e $R$ é definido de forma análoga à da Equação 1, produzindo a expressão

$$R_P^{J_{ydh}} = \frac{\partial J_{ydh}}{\partial P} \cdot \frac{P}{J_{ydh}}$$

Usando a mesma lógica e os métodos gráficos descritos anteriormente para determinar $C$, obtém-se $R$ como a inclinação da tangente da curva de ln $J$ *versus* ln $P$.

Os três coeficientes descritos estão relacionados desta maneira simples:

$$R_P^{J_{ydh}} = C_{xase}^{J_{ydh}} \cdot \varepsilon_P^{xase}$$

Assim, a capacidade de resposta de cada enzima em uma via a uma alteração em um fator controlador externo é uma função simples de duas coisas: o coeficiente de controle, variável que expressa o quanto essa enzima influencia o fluxo sob um dado conjunto de condições, e a elasticidade, propriedade intrínseca da enzima que reflete a sua sensibilidade à concentração do substrato e do efetor.

sim, em princípio, é possível predizer de que maneira será alterado o fluxo do substrato por uma série de etapas enzimáticas quando existe uma alteração em um ou mais fatores controladores externos à via. O Quadro 15-1 mostra como esses conceitos qualitativos são tratados quantitativamente.

## A análise do controle metabólico foi aplicada ao metabolismo de carboidratos, com resultados surpreendentes

A análise do controle metabólico proporciona uma estrutura que permite pensar quantitativamente sobre regulação, interpretar o significado das propriedades reguladoras de cada enzima em uma via, identificar as etapas que mais afetam o fluxo pela via, e distinguir entre os mecanismos *reguladores* que atuam na manutenção das concentrações dos metabólitos e os mecanismos de *controle* que alteram efetivamente o fluxo da via. A análise da via glicolítica em leveduras, por exemplo, revelou um coeficiente de controle de fluxo para a PFK-1 inesperadamente baixo, o qual, como se percebe, foi determinado como o ponto principal do controle do fluxo – a "etapa determinante da velocidade" – na glicólise. A elevação experimental do nível da PFK-1 em cinco vezes leva a uma alteração no fluxo pela glicólise

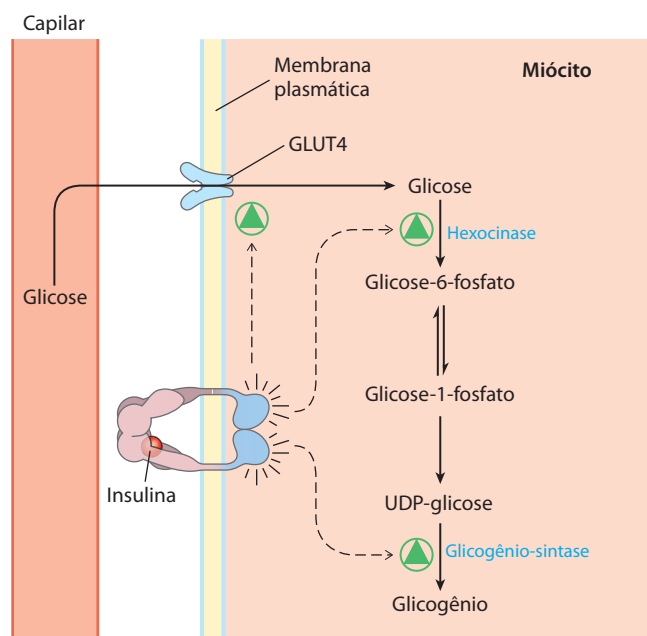
de menos de 10%, sugerindo que o papel real da regulação pela PFK-1 não é controlar o fluxo pela glicólise, mas mediar a homeostasia de metabólitos – para prevenir grandes mudanças na concentração dos metabólitos quando o fluxo pela glicólise aumenta em resposta à glicose sanguínea alta ou à insulina. Relembre que o estudo da glicólise em extrato de fígado (Figura 15-9) também produziu um coeficiente de controle de fluxo que discordou do conhecimento convencional; mostrou que a hexocinase, e não a PFK-1, é mais influente no ajuste do fluxo ao longo da glicólise. Deve-se observar aqui que o extrato de fígado não é equivalente a um hepatócito; a maneira ideal de estudar o controle do fluxo é manipulando uma enzima de cada vez na célula viva. Isso já é possível em muitos casos.

Os pesquisadores usaram ressonância magnética nuclear (RMN) como uma maneira não invasiva de determinar a concentração de glicogênio e de metabólitos nas cinco etapas da via desde a glicose no sangue até o glicogênio nos miócitos (**Figura 15-12**) de músculo de rato e de humanos. Descobriram que o coeficiente de controle de fluxo pela glicogênio-sintase foi menor do que para o transportador de glicose (GLUT4) ou para a hexocinase. (Discutem-se a glicogênio-sintase e outras enzimas do metabolismo do glicogênio nas Seções 15.4 e 15.5.) Esse achado contradiz o conhecimento convencional de que a glicogênio-sintase é o local do controle do fluxo e sugere que a importância da fosforilação/desfosforilação dessa enzima esteja relacionada com a manutenção da homeostasia de metabólitos – isto é, *regulação*, e não *controle*. Dois metabólitos dessa via, glicose e glicose-6-fosfato, são

**FIGURA 15-12 Controle da síntese de glicogênio no músculo, a partir da glicose sanguínea.** A insulina afeta três das cinco etapas desta via, mas é o efeito sobre o transporte e sobre a atividade da hexocinase que aumenta o fluxo para o glicogênio e não a mudança na atividade da glicogênio-sintase.

intermediários-chave em outras vias, incluindo a glicólise, a via das pentoses-fosfato e a síntese da glicosamina. A análise do controle metabólico sugere que, quando o nível da glicose sanguínea se eleva, a insulina atua no músculo para (1) aumentar o transporte da glicose para as células levando GLUT4 para a membrana plasmática, (2) induzir a síntese de hexocinase, e (3) ativar a glicogênio-sintase por modificação covalente (ver Figura 15-41). Os dois primeiros efeitos da insulina aumentam o fluxo de glicose pela via (controle), e o terceiro serve para adaptar a atividade da glicogênio-sintase de modo que os níveis de metabólitos (p. ex., glicose-6-fosfato) não aumentem drasticamente com o fluxo aumentado (regulação).

## A análise do controle metabólico sugere um método geral para o aumento do fluxo por uma via

Como um pesquisador pode manipular uma célula para aumentar o fluxo sem alterar as concentrações dos outros metabólitos ou os fluxos ao longo de outras vias? Mais de três décadas atrás, Henrik Kacser previu, com base na análise do controle metabólico, que isso seria possível pelo aumento da concentração de cada enzima da via. A predição foi confirmada em vários testes experimentais, e também concorda com a maneira pela qual as células normalmente controlam os fluxos ao longo das vias. Por exemplo, ratos alimentados com dieta rica em proteína eliminam o excesso de grupos amino convertendo-os em ureia no ciclo da ureia (Capítulo 18). Com essa mudança da dieta, a produção de ureia aumenta quatro vezes, e as enzimas do ciclo da ureia aumentam de duas a três vezes. De modo similar, quando o aumento da oxidação dos ácidos graxos é desencadeado pela ativação do receptor $\gamma$ ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR$\gamma$, fator de transcrição ativado por ligante; ver Figura 21-22), aumenta a síntese de *toda a série* de enzimas de oxidação dos ácidos graxos. Com o crescimento do uso de microarranjos de DNA no estudo da expressão de grupos completos de genes em resposta a várias perturbações, logo se saberia se esse é um mecanismo geral pelo qual as células realizam ajustes de longo prazo no fluxo ao longo de vias específicas.

### RESUMO 15.2 Análise do controle metabólico

- A análise do controle metabólico mostra que a velocidade do fluxo metabólico por uma via se distribui entre várias enzimas na via.
- O coeficiente de controle de fluxo, $C$, é uma medida determinada experimentalmente do efeito da concentração de uma enzima sobre o fluxo por uma via multienzimática. Não é uma característica intrínseca da enzima, mas do sistema como um todo.
- O coeficiente de elasticidade, $\varepsilon$, de uma enzima é uma medida determinada experimentalmente de sua capacidade de resposta a alterações na concentração de um metabólito ou de uma molécula reguladora.
- O coeficiente de resposta, $R$, é uma medida determinada experimentalmente da alteração no fluxo por uma via

em resposta a um hormônio regulador ou a um segundo mensageiro. É uma função de $C$ e de $\varepsilon$: $R = C \cdot \varepsilon$.

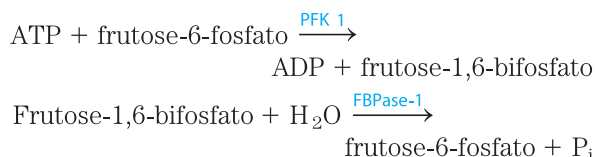
- Algumas enzimas reguladas controlam o fluxo ao longo de uma via, enquanto outras reequilibram o nível dos metabólitos em resposta a alterações no fluxo. A primeira atividade é *controle*; a segunda, de reequilíbrio, é *regulação*.
- A análise do controle metabólico prevê, e os experimentos confirmam, que o fluxo na direção de um produto específico é aumentado de maneira mais eficiente pela elevação da concentração de todas as enzimas da via.

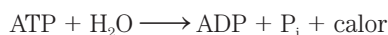
## 15.3 Regulação coordenada da glicólise e da gliconeogênese

Nos mamíferos, a **gliconeogênese** acontece principalmente no fígado, onde tem o papel de fornecer glicose para exportar para outros tecidos quando se exaurem os estoques de glicogênio e quando não há disponibilidade de glicose na dieta. Conforme discutido no Capítulo 14, a gliconeogênese utiliza várias das enzimas que atuam na glicólise, mas não é simplesmente o seu reverso. Sete reações glicolíticas são livremente reversíveis, e as enzimas que catalisam estas reações também atuam na gliconeogênese (**Figura 15-13**). Três reações da glicólise, de tão exergônicas, são essencialmente irreversíveis: as catalisadas por hexocinase, PFK-1 e piruvato-cinase. As três reações têm um $\Delta G'$ grande e negativo (a Tabela 15-3 mostra os valores no músculo cardíaco). A gliconeogênese usa desvios em cada uma dessas etapas irreversíveis; por exemplo, a conversão da frutose-1,6-bifosfato em frutose-6-fosfato é catalisada pela frutose-1,6-bifosfatase (FBPase-1). Cada uma dessas reações de desvio também tem um $\Delta G'$ grande e negativo.

Em cada um dos três pontos onde as reações glicolíticas são desviadas por reações gliconeogênicas alternativas, a operação simultânea de ambas as vias consome ATP sem realizar nenhum trabalho químico ou biológico. Por exemplo, a PFK-1 e a FBPase-1 catalisam reações opostas:

$$\text{ATP} + \text{frutose-6-fosfato} \xrightarrow{\text{PFK 1}} \text{ADP} + \text{frutose-1,6-bifosfato}$$

$$\text{Frutose-1,6-bifosfato} + H_2O \xrightarrow{\text{FBPase-1}} \text{frutose-6-fosfato} + P_i$$

A soma destas duas reações é

$$\text{ATP} + H_2O \longrightarrow \text{ADP} + P_i + \text{calor}$$

isto é, hidrólise de ATP sem realizar nenhuma atividade metabólica útil. Se estas duas reações prosseguirem simultaneamente em uma velocidade alta na mesma célula, uma grande quantidade de energia será dissipada na forma de calor. Esse processo antieconômico é denominado **ciclo fútil**. No entanto, como será visto mais tarde, tais ciclos podem proporcionar vantagens em vias de controle, e o termo **ciclo de substrato** é uma denominação melhor.

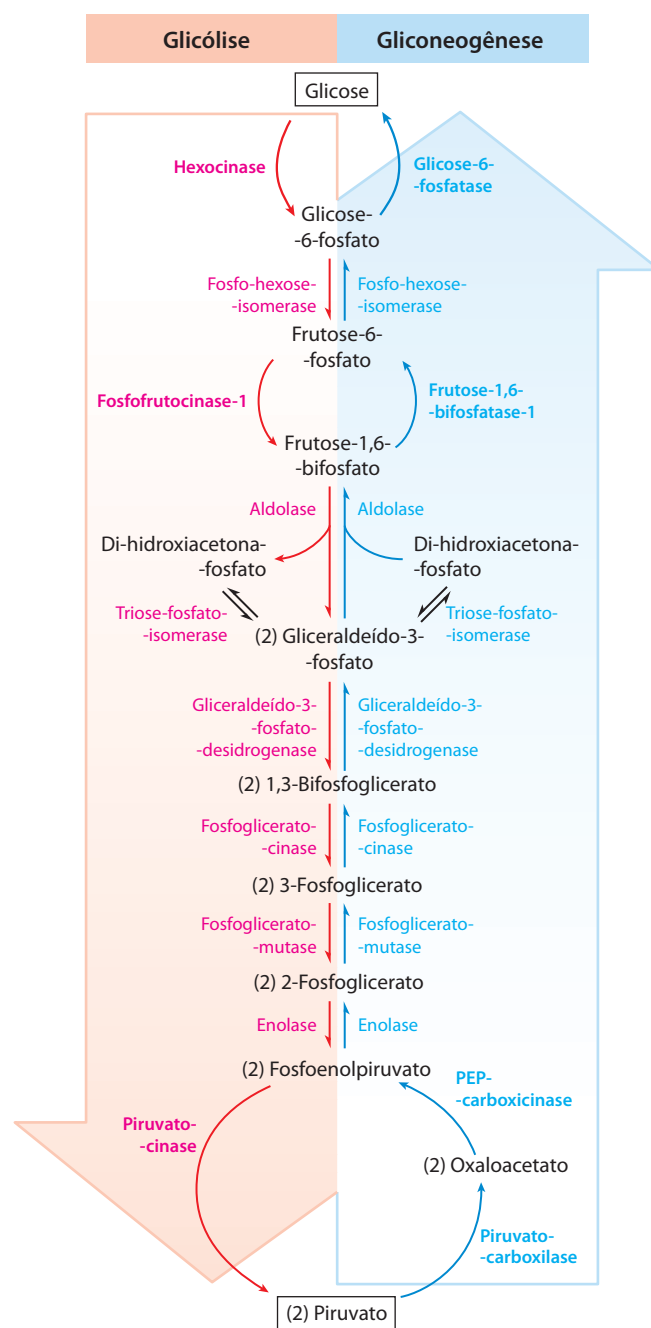



**FIGURA 15-13 Glicólise e gliconeogênese.** Vias opostas da glicólise (em cor-de-rosa) e da gliconeogênese (em azul) no fígado de rato. Três etapas são catalisadas por enzimas diferentes na gliconeogênese (as "reações de desvio") e na glicólise; sete etapas são catalisadas pelas mesmas enzimas nas duas vias. Para simplificar, os cofatores foram omitidos.

Ciclos de substrato semelhantes também ocorrem com os outros dois grupos de reações de desvio na gliconeogênese (Figura 15-13).

Agora serão analisados com mais detalhe os mecanismos que regulam a glicólise e a gliconeogênese nos três pontos nos quais essas vias divergem.

## As isoenzimas da hexocinase do músculo e do fígado são afetadas diferentemente por seu produto, glicose-6-fosfato

A hexocinase, que catalisa a entrada da glicose na via glicolítica, é uma enzima reguladora. Os humanos têm quatro isoenzimas (designadas de I a IV), codificadas por quatro diferentes genes. As **isoenzimas** são proteínas diferentes que catalisam a mesma reação (Quadro 15-2). A isoenzima da hexocinase predominante dos miócitos (**hexocinase II**) tem alta afinidade pela glicose – ela atinge a metade da saturação em 0,1 mM. Uma vez que a glicose que entra nos miócitos a partir do sangue (onde sua concentração é de 4 a 5 mM) gera uma concentração intracelular de glicose suficientemente alta para saturar a hexocinase I, a enzima normalmente age na sua velocidade máxima ou próxima dela. A **hexocinase I** do músculo e a hexocinase II são inibidas alostericamente por seu produto, a glicose-6-fosfato, de forma que, sempre que a concentração intracelular de glicose se eleva acima do seu nível normal, essas enzimas são temporária e reversivelmente inibidas, levando a velocidade da formação da glicose-6-fosfato ao equilíbrio com a velocidade de sua utilização e reestabelecendo o estado estável.

### QUADRO 15-2 Isoenzimas: proteínas diferentes que catalisam a mesma reação

As quatro formas de hexocinase encontradas nos tecidos de mamíferos são apenas um exemplo de uma situação biológica comum: a mesma reação sendo catalisada por duas ou mais formas moleculares diferentes da mesma enzima. Essas múltiplas formas, chamadas de isozimas ou isoenzimas, podem ocorrer na mesma espécie, no mesmo tecido, até na mesma célula. As diferentes formas (isoformas) da enzima geralmente diferem nas propriedades cinéticas ou reguladoras, no cofator utilizado (p. ex., NADH ou NADPH no caso das isoenzimas desidrogenases), ou na sua distribuição subcelular (solúvel ou ligada à membrana). As isoenzimas podem ter sequências de aminoácidos similares, mas não idênticas, e em muitos casos elas compartilham claramente uma origem evolutiva comum.

Uma das primeiras enzimas para a qual se encontrou isoenzimas foi a lactato-desidrogenase (LDH; p. 563), que existe nos tecidos dos vertebrados em pelo menos cinco formas diferentes separáveis por eletroforese. Todas as isoenzimas de LDH têm quatro cadeias polipeptídicas (cada uma com $M_r$ de 33.500), e cada tipo tem uma proporção diferente de dois tipos de polipeptídeos. A cadeia M (de músculo) e a cadeia H (de coração) são codificadas por dois genes diferentes.

A isoenzima predominante no músculo esquelético possui quatro cadeias M, e no coração a isoenzima predominante possui quatro cadeias H. Outros tecidos têm combinações dos cinco tipos possíveis de LDH:

| Tipo | Composição | Localização |
|---|---|---|
| $LDH_1$ | HHHH | Coração e eritrócito |
| $LDH_2$ | HHHM | Coração e eritrócito |
| $LDH_3$ | HHMM | Cérebro e rim |
| $LDH_4$ | HMMM | Músculo esquelético e fígado |
| $LDH_5$ | MMMM | Músculo esquelético e fígado |

As diferenças no conteúdo das isoenzimas entre os tecidos podem ser usadas para avaliar o tempo e a extensão do dano cardíaco em consequência de um infarto do miocárdio (ataque cardíaco). O dano ao tecido cardíaco resulta na liberação de LDH para o sangue. Logo após um ataque cardíaco, o nível sanguíneo total de LDH aumenta, e existe mais $LDH_2$ do que $LDH_1$. Após 12 horas, as quantidades de $LDH_1$ e de $LDH_2$ são muito semelhantes, e após 24 horas existe mais $LDH_1$ do que $LDH_2$. Essa mudança na relação $[LDH_1]/[LDH_2]$, combinada com o aumento da concentração sanguínea de outra enzima cardíaca, a creatina-cinase, é evidência muito forte de um infarto do miocárdio recente. ■

As diferentes isoenzimas de LDH apresentam valores de $V_{máx}$ e de $K_m$ significativamente diferentes, em especial para o piruvato. As propriedades da $LDH_4$ favorecem a redução rápida de concentrações muito baixas de piruvato a lactato no músculo esquelético, enquanto as propriedades da isoenzima $LDH_1$ favorecem a oxidação rápida do lactato a piruvato no coração.

Em geral, a distribuição das diferentes isoenzimas de uma dada enzima reflete pelo menos quatro fatores:

1. *Padrões metabólicos diferentes em órgãos diferentes*. Para a glicogênio-fosforilase, as isoenzimas no músculo esquelético e no fígado têm propriedades reguladoras diferentes, refletindo os diferentes papéis da degradação do glicogênio nesses dois tecidos.
2. *Localizações e papéis metabólicos diferentes para isoenzimas na mesma célula.* As isoenzimas da isocitrato-desidrogenase do citosol e da mitocôndria são um exemplo (Capítulo 16).
3. *Estágios de desenvolvimento diferentes em tecidos fetais ou embrionários e em tecidos adultos*. Por exemplo, o fígado fetal tem uma distribuição característica da isoenzima LDH, que se altera à medida que o órgão se desenvolve na sua forma adulta. Algumas enzimas do catabolismo da glicose em células malignas (cancerígenas) ocorrem como suas isoenzimas fetais e não adultas.
4. *Respostas diferentes de isoenzimas aos moduladores alostéricos*. Esta diferença é útil na regulação mais fina das taxas metabólicas. A hexocinase IV (glicocinase) do fígado e as suas isoenzimas de outros tecidos diferem na sua sensibilidade à inibição pela glicose-6-fosfato.

As diferentes isoenzimas de hexocinase do fígado e do músculo refletem os diferentes papéis desses órgãos no metabolismo de carboidratos: o músculo consome glicose, usando-a para produção de energia, enquanto o fígado mantém a homeostasia da glicose sanguínea produzindo ou consumindo o açúcar, dependendo da sua concentração sanguínea prevalente. A isoenzima da hexocinase predominante no fígado é a **hexocinase IV** (glicocinase), que difere das hexocinases I-III de músculo em três importantes aspectos. Em primeiro lugar, a concentração de glicose na qual a hexocinase IV atinge a metade da saturação (10 mM) é maior do que sua concentração normal no sangue. Uma vez que um transportador de glicose eficiente nos hepatócitos (**GLUT2**) equilibra rapidamente a concentração de glicose no citosol e no sangue (ver, na Figura 11-30, a cinética do mesmo transportador, GLUT2, em eritrócitos), o alto $K_m$ da hexocinase IV permite sua regulação direta pelo nível de glicose sanguínea (**Figura 15-14**). Quando a glicose sanguínea é alta, como acontece após uma refeição rica em carboidratos, o excesso de glicose é transportado para os hepatócitos, onde a hexocinase IV o converte a glicose-6-fosfato. Como a hexocinase não está saturada em 10 mM de glicose, sua atividade continua aumentando à medida que a concentração da glicose se eleva para 10 mM ou mais. Sob condições de glicose sanguínea baixa, a concentração do açúcar no hepatócito é baixa em relação ao $K_m$ da hexocinase IV, e a glicose gerada pela gliconeogênese deixa a célula antes de ficar retida pela fosforilação.

Em segundo lugar, a hexocinase IV não é inibida pela glicose-6-fosfato e, por isso, pode continuar agindo quando o acúmulo do substrato inibe completamente as hexocinases I-III. Finalmente, a hexocinase IV está sujeita à inibição pela interação reversível com uma proteína reguladora específica do fígado (**Figura 15-15**). A ligação é muito mais forte na presença do efetor alostérico frutose-6-fosfato. A glicose compete com a frutose-6-fosfato e causa a dissociação da proteína reguladora da hexocinase, removendo a inibição. Imediatamente após uma refeição rica em carboidratos, quando a glicose sanguínea estiver alta, ela entra nos hepatócitos via GLUT2 e ativa a hexocinase por esse mecanismo. Durante o jejum, quando os níveis de glicose no sangue diminuem para menos de 5 mM, a frutose-6-fosfato provoca a inibição da hexocinase IV pela proteína reguladora, de forma que o fígado não compete com outros órgãos pela glicose escassa. O mecanismo de inibição pela proteína reguladora é interessante: a proteína ancora a enzima dentro do núcleo, onde ela fica segregada das outras enzimas da glicólise no citosol (Figura 15-15). Quando a concentração da glicose no citosol se eleva, ela equilibra com a glicose no núcleo pelo transporte por meio dos poros nucleares. A glicose causa a dissociação da proteína reguladora, e a hexocinase passa para o citosol e inicia a fosforilação da glicose.

**FIGURA 15-14 Comparação entre as propriedades cinéticas da hexocinase IV (glicocinase) e da hexocinase I.** Observe a característica sigmoide para a curva da hexocinase IV e o $K_m$ muito mais baixo para a hexocinase I. Quando a glicose sanguínea se eleva acima de 5 mM, a atividade da hexocinase IV aumenta, mas a hexocinase I já está agindo próximo de sua $V_{máx}$ e não pode responder ao aumento da concentração da glicose. As hexocinases I, II e III têm propriedades cinéticas semelhantes.

## A hexocinase IV (glicocinase) e a glicose-6-fosfatase são reguladas na transcrição

A hexocinase também é regulada ao nível de síntese proteica. As condições que demandam uma produção maior de energia (baixa [ATP], alta [AMP], contração muscular vigorosa) ou maior consumo de glicose (p. ex., glicose sanguínea alta) causam aumento na transcrição do gene da hexocinase IV. A glicose-6-fosfatase, a enzima gliconeogênica que faz o desvio da etapa da hexocinase na glicólise, é

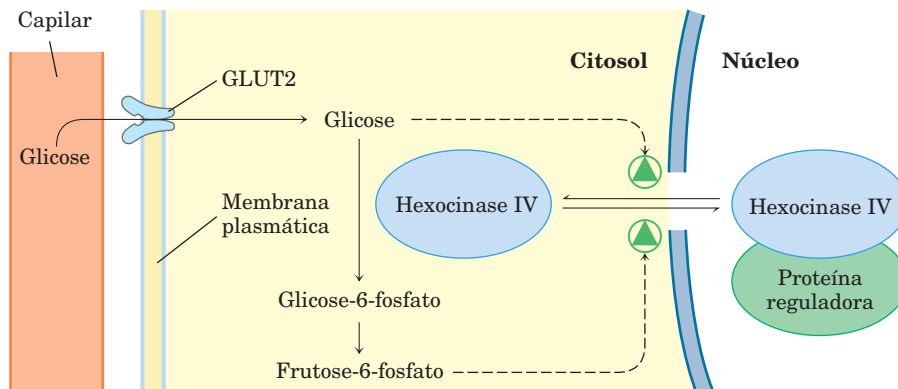



**FIGURA 15-15 Regulação da hexocinase IV (glicocinase) por sequestro no núcleo.** O inibidor proteico da hexocinase IV é uma proteína de ligação nuclear que carrega a enzima para dentro do núcleo quando a concentração da frutose-6-fosfato está alta no fígado e a libera para o citosol quando a concentração da glicose está alta.

regulada no nível da transcrição por fatores que demandam aumento na produção de glicose (glicose sanguínea baixa, sinalização por glucagon). A regulação da transcrição destas duas enzimas (juntamente com outras enzimas da glicólise e da gliconeogênese) está descrita a seguir.

## A regulação da fosfofrutocinase-1 e da frutose-1,6-bifosfatase é recíproca

Conforme observado, a glicose-6-fosfato pode circular na glicólise ou por várias outras vias, incluindo na via de síntese do glicogênio ou na via das pentoses-fosfato. A reação metabolicamente irreversível catalisada pela PFK-1 é a etapa que compromete a glicose com a glicólise. Essa enzima complexa tem, além dos seus sítios de ligação ao substrato, vários sítios reguladores aos quais se ligam os ativadores ou os inibidores alostéricos.

O ATP não é somente um substrato para a PFK-1, sendo também um produto final da via glicolítica. Quando a concentração celular alta de ATP sinaliza que ele está sendo produzido mais rapidamente do está sendo consumido, o mesmo inibe a PFK-1 por se ligar a um sítio alostérico na enzima, o que reduz sua afinidade pelo substrato frutose-6--fosfato (**Figura 15-16**). ADP e AMP, cujas concentrações aumentam à medida que o consumo de ATP suplanta a produção, atuam alostericamente para liberar a inibição pelo ATP. Esses efeitos se combinam para produzir atividade enzimática mais elevada quando o ADP e o AMP se acumulam e mais baixa quando o ATP se acumula.

O citrato (a forma ionizada do ácido cítrico), intermediário-chave na oxidação aeróbia do piruvato, dos ácidos graxos e dos aminoácidos, é também um regulador alostérico da PFK-1; concentração alta de citrato aumenta o efeito inibidor do ATP, reduzindo ainda mais o fluxo de glicose pela glicólise. Nesse caso, assim como em vários outros encontrados adiante, o citrato serve como sinal intracelular de que a célula está satisfazendo suas necessidades de energia metabólica pela oxidação de ácidos graxos e proteínas.

A etapa correspondente na gliconeogênese é a conversão da frutose-1,6-bifosfato em frutose-6-fosfato (**Figura 15-17**). A enzima que catalisa essa reação, FBPase-1, é fortemente inibida (alostericamente) pelo AMP; quando o suprimento de ATP da célula está baixo (correspondendo a uma alta [AMP]), diminui a síntese de glicose que requer ATP.

Assim, essas etapas opostas nas vias glicolítica e gliconeogênica – catalisadas por PFK-1 e FBPase-1 – são reguladas de uma forma coordenada e recíproca. Em geral, quando há concentração suficiente de acetil-CoA ou de citrato (produto da condensação da acetil-CoA com oxaloacetato) ou quando uma alta proporção do adenilato da célula está na forma de ATP, a gliconeogênese é favorecida. Quando o nível de AMP aumenta, isso promove a glicólise pela estimulação da PFK-1 (e, como será visto na Seção 15.5, promove a degradação do glicogênio pela ativação da glicogênio-fosforilase).

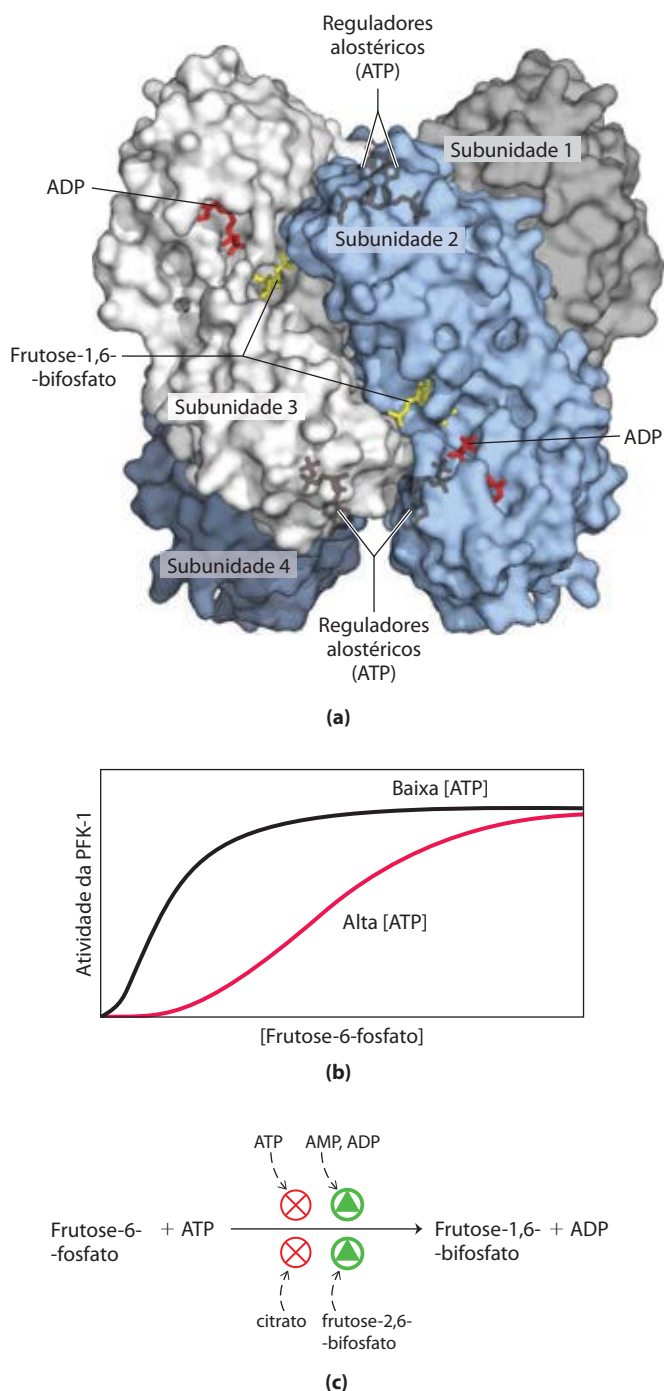



**FIGURA 15-16 A fosfofrutocinase-1 (PFK-1) e sua regulação. (a)** Imagem de contorno de superfície da PFK-1 de *E. coli*, mostrando suas quatro subunidades idênticas (PDB ID 1PFK). Cada subunidade tem seu próprio sítio catalítico, no qual os produtos ADP e frutose 1,6-bifosfato (modelos de esfera e bastão, respectivamente em vermelho e amarelo) quase entram em contato, e seus próprios sítios de ligação ao regulador alostérico ATP, escondido na proteína nas posições indicadas. **(b)** Regulação alostérica da PFK-1 de músculo pelo ATP, ilustrada pela curva substrato-atividade. Em baixa [ATP], a $K_{0,5}$ para a frutose-6-fosfato é relativamente baixa, permitindo que a enzima atue em uma velocidade alta em [frutose-6-fosfato] relativamente baixa. (Relembre do Capítulo 6 que $K_{0,5}$ é o $K_m$ para as enzimas reguladoras.) Quando a [ATP] é alta, $K_{0,5}$ para a frutose-6-fosfato é muito aumentada, conforme indicado pela relação sigmoide entre a concentração do substrato e a atividade da enzima. **(c)** Resumo dos reguladores que afetam a atividade da PFK-1.

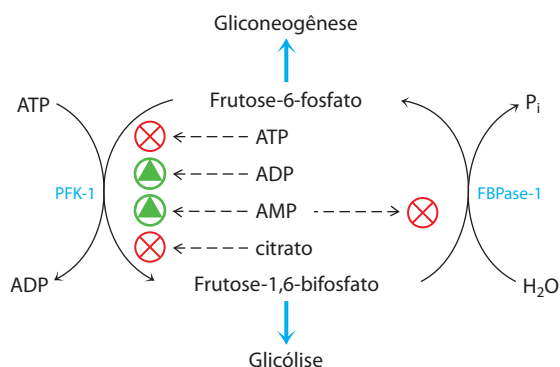
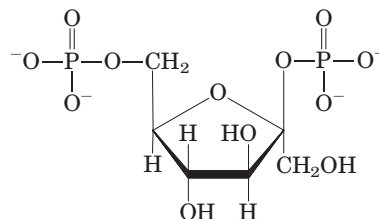



**FIGURA 15-17 Regulação da frutose-1,6-bifosfatase (FBPase-1) e da fosfofrutocinase-1 (PFK-1).** O importante papel da frutose-2,6-bifosfato na regulação deste ciclo de substrato está detalhado nas figuras subsequentes.

## A frutose-2,6-bifosfato é um regulador alostérico potente da PFK-1 e da FBPase-1

O papel especial do fígado na manutenção de um nível constante de glicose sanguínea requer mecanismos reguladores adicionais para coordenar a produção e o consumo de glicose. Quando o nível de glicose no sangue diminui, o hormônio **glucagon** sinaliza para o fígado produzir e liberar mais glicose e parar de consumi-la para suas próprias necessidades. Uma das fontes de glicose é o glicogênio armazenado no fígado; outra fonte é via gliconeogênese, usando piruvato, lactato, glicerol ou determinados aminoácidos como material de partida. Quando a glicose sanguínea está alta, a insulina sinaliza para o fígado usar o açúcar como combustível e como precursor na síntese e no armazenamento de glicogênio e triacilglicerol.

A regulação hormonal rápida da glicólise e da gliconeogênese é mediada pela **frutose-2,6-bifosfato**, efetor alostérico das enzimas PFK-1 e FBPase-1:

Frutose-2,6-bifosfato

Quando a frutose-2,6-bifosfato se liga ao seu sítio alostérico na PFK-1, ela aumenta a afinidade dessa enzima pelo seu substrato, frutose-6-fosfato, e reduz a afinidade pelos inibidores alostéricos ATP e citrato (**Figura 15-18**). Em

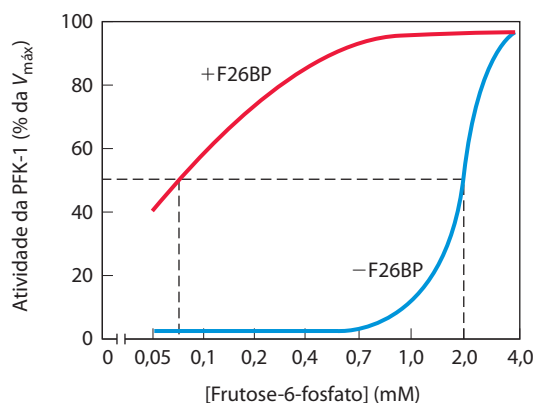
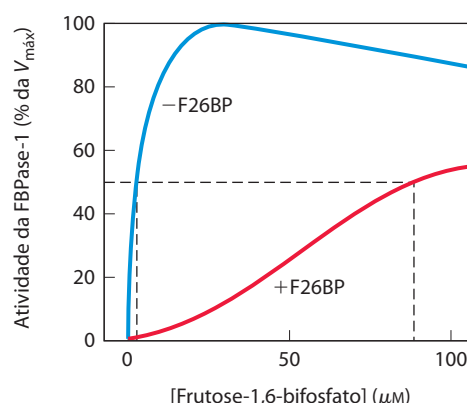
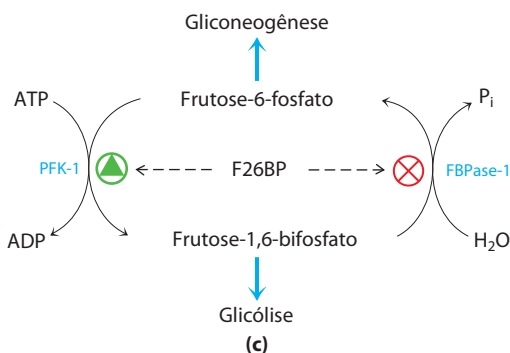



**FIGURA 15-18 Papel da frutose-2,6-bifosfato na regulação da glicólise e da gliconeogênese.** A frutose-2,6-bifosfato (F26BP) tem efeitos opostos sobre a atividade enzimática da fosfofrutocinase-1 (PFK-1, enzima glicolítica) e da frutose-1,6-bifosfatase (FBPase-1, enzima gliconeogênica). **(a)** A atividade da PFK-1 na ausência de F26BP (curva azul) é a metade da máxima quando a concentração da frutose-6-fosfato é 2 mM (isto é, $K_{0,5} = 2$ mM). Quando 0,13 μM de F26BP está presente (curva vermelha), $K_{0,5}$ para a frutose-6-fosfato é somente 0,08 mM. Assim, a F26BP ativa a PFK-1 por aumentar sua afinidade aparente pela frutose-6-fosfato (ver Figura 15-16b). **(b)** A atividade da FBPase-1 é inibida por 1 μM de F26BP, sendo fortemente inibida por 25 μM. Na ausência do seu inibidor (curva azul), $K_{0,5}$ para a frutose-1,6-bifosfato é 5 μM, mas na presença de 25 μM de F26BP (curva vermelha), $K_{0,5}$ é $>$ 70 μM. A frutose-2,6--bifosfato também torna a FBPase-1 mais sensível à inibição por outro regulador alostérico, AMP. **(c)** Resumo da regulação por F26BP.

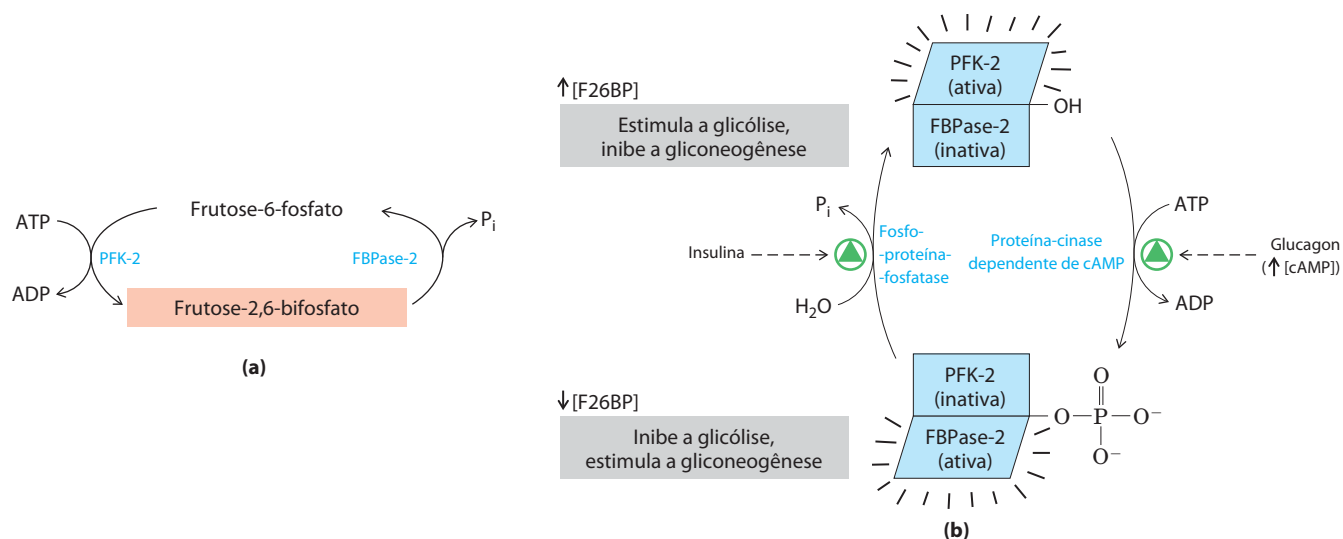



**FIGURA 15-19** **Regulação do nível da frutose-2,6-bifosfato.** **(a)** A concentração celular do regulador frutose-2,6-bifosfato (F26BF) é determinada pelas taxas de sua síntese pela fosfofrutocinase-2 (PFK-2) e sua degradação pela frutose-2,6-bifosfatase (FBPase-2). **(b)** Ambas as atividades enzimáticas são parte da mesma cadeia polipeptídica, sendo reciprocamente reguladas pela insulina e pelo glucagon.

concentrações fisiológicas de seus substratos, ATP e frutose-6-fosfato, e de seus efetores positivos ou negativos (ATP, AMP, citrato), a PFK-1 está praticamente inativa na ausência da frutose-2,6-bifosfato, que tem efeito oposto sobre a FBPase-1: ela reduz a afinidade pelo seu substrato (Figura 15-18b), reduzindo a gliconeogênese.

A concentração celular do regulador alostérico frutose-2,6-bifosfato é ajustada pelas taxas relativas de sua formação e degradação (**Figura 15-19a**). Ela se forma pela fosforilação da frutose-6-fosfato, catalisada pela **fosfofrutocinase-2** (**PFK-2**) e é degradada pela **frutose-2,6-bifosfatase** (**FBPase-2**). (Observe que essas enzimas são distintas da PFK-1 e a FBPase-1, que catalisam, respectivamente, a síntese e a degradação da frutose-1,6-bifosfato. PFK-2 e FBPase-2 são duas atividades enzimáticas separadas de uma única proteína bifuncional. O equilíbrio dessas duas atividades no fígado, que determina o nível celular da frutose-2,6-bifosfato, é regulado pelo glucagon e pela insulina (Figura 15-19b).

Conforme visto no Capítulo 12 (p. 446), o glucagon estimula a adenilil-ciclase do fígado a sintetizar 3′,5′-AMP cíclico (cAMP) a partir de ATP. O AMP cíclico ativa a proteína-cinase dependente de cAMP, a qual transfere um grupo fosforil do ATP para a proteína bifuncional PFK-2/FBPase-2. A fosforilação desta proteína aumenta sua atividade de FBPase-2 e inibe a atividade de PFK-2. Dessa forma, o glucagon reduz o nível celular de frutose-2,6-bifosfato, inibindo a glicólise e estimulando a gliconeogênese. A produção de mais glicose permite ao fígado repor a glicose sanguínea em resposta ao glucagon. A insulina tem o efeito oposto, estimulando a atividade de uma fosfoproteína-fosfatase que catalisa a remoção do grupo fosforil da proteína bifuncional PFK-2/FBPase-2, ativando sua atividade de PFK-2, aumentando o nível de frutose-2,6-bifosfato, estimulando a glicólise e inibindo a gliconeogênese.

## A xilulose-5-fosfato é um regulador-chave do metabolismo dos carboidratos e das gorduras

Outro mecanismo regulador atua também por meio do controle do nível de frutose-2,6-bifosfato. No fígado de mamíferos, a xilulose-5-fosfato (p. 577), um produto da via das pentoses-fosfato (via das hexoses-monofosfato), controla o aumento da glicólise que se segue à ingestão de uma refeição rica em carboidratos. A concentração da xilulose-5-fosfato aumenta à medida que a glicose que entra no fígado é convertida em glicose-6-fosfato e entra tanto na via glicolítica como na das pentoses-fosfato. A xilulose-5-fosfato ativa a fosfoproteína-fosfatase 2A (PP2A; **Figura 15-20**), a qual desfosforila a enzima bifuncional PFK-2/FBPase-2 (Figura 15-19). A desfosforilação ativa a PFK-2 e inibe a FBPase-2, e o aumento na concentração da frutose-2,6-bifosfato estimula a glicólise e inibe a gliconeogênese. A glicólise aumentada impulsiona a produção de acetil-CoA, enquanto o fluxo aumentado de hexoses pela via das pentoses-fosfato gera NADPH. Acetil-CoA e NADPH são os materiais de partida para a síntese de ácidos graxos e que, sabe-se de longa data, aumentam drasticamente em resposta à ingestão de uma refeição rica em carboidratos. A xilulose-5-fosfato também aumenta a síntese de *todas* as enzimas necessárias na síntese de ácidos graxos, satisfazendo a predição a partir da análise do controle metabólico. Esse efeito será esmiuçado na discussão sobre a integração do metabolismo de carboidratos e gorduras no Capítulo 23.

## A enzima glicolítica piruvato-cinase é inibida alostericamente por ATP

Nos vertebrados são encontradas pelo menos três isoenzimas da piruvato-cinase, que diferem na sua distribuição tecidual e nas suas respostas aos moduladores. Altas concen-

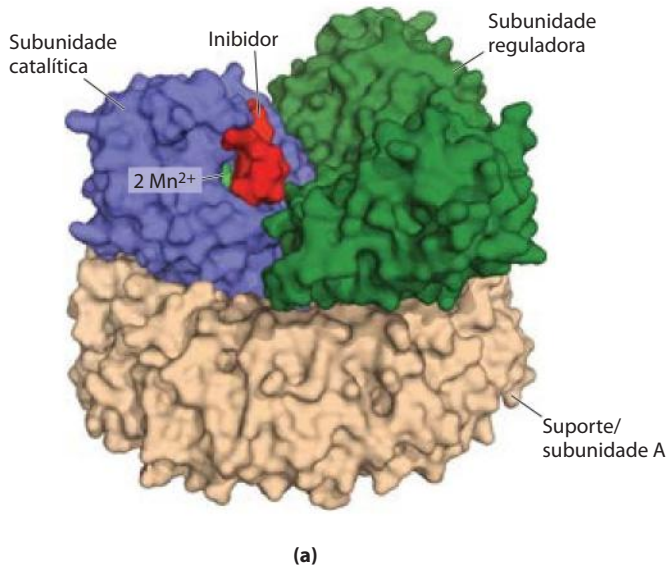
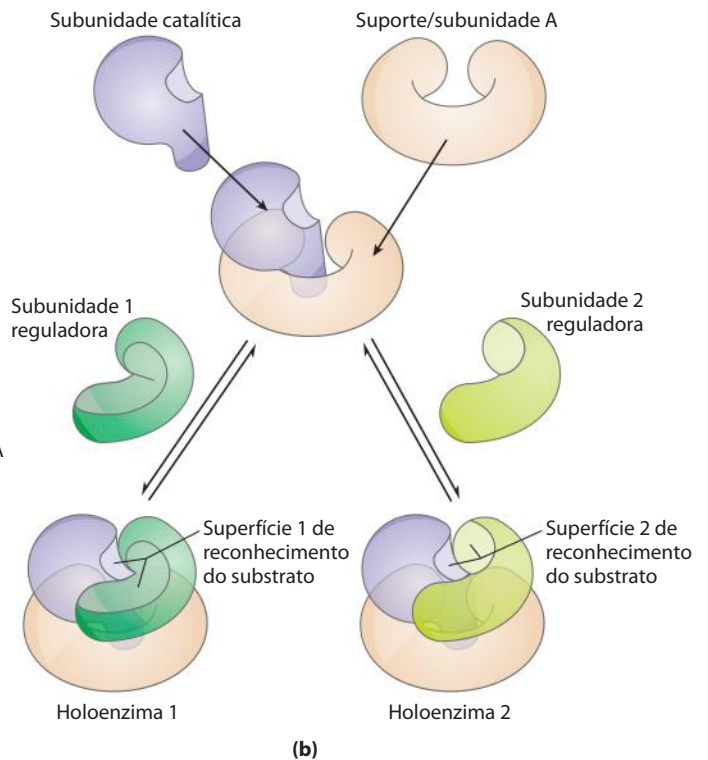



**FIGURA 15-20 Estrutura e ação da fosfoproteína-fosfatase 2A (PP2A). (a)** A subunidade catalítica tem dois íons $Mn^{2+}$ no seu sítio ativo, posicionados próximos à superfície de reconhecimento do substrato formada pela interface entre a subunidade catalítica e a reguladora (PDB ID 2NPP). A microcistina-LR, mostrada aqui em vermelho, é um inibidor específico de PP2A. A subunidade catalítica e a reguladora repousam em um suporte (a subunidade A) que as posiciona uma em relação à outra e forma o sítio de reconhecimento do substrato. **(b)** A PP2A reconhece várias proteínas-alvo, e sua especificidade é proporcionada pela subunidade reguladora. As várias subunidades reguladoras se encaixam no suporte que contém a subunidade catalítica, e cada subunidade reguladora cria seu sítio exclusivo de ligação ao substrato.

trações de ATP, acetil-CoA e ácidos graxos de cadeia longa (sinais de suprimento abundante de energia) inibem alostericamente todas as isoenzimas da piruvato-cinase (**Figura 15-21**). A isoenzima do fígado (forma L), mas não a do músculo (forma M), está sujeita à regulação adicional por fosforilação. Quando a redução da glicose sanguínea cau-

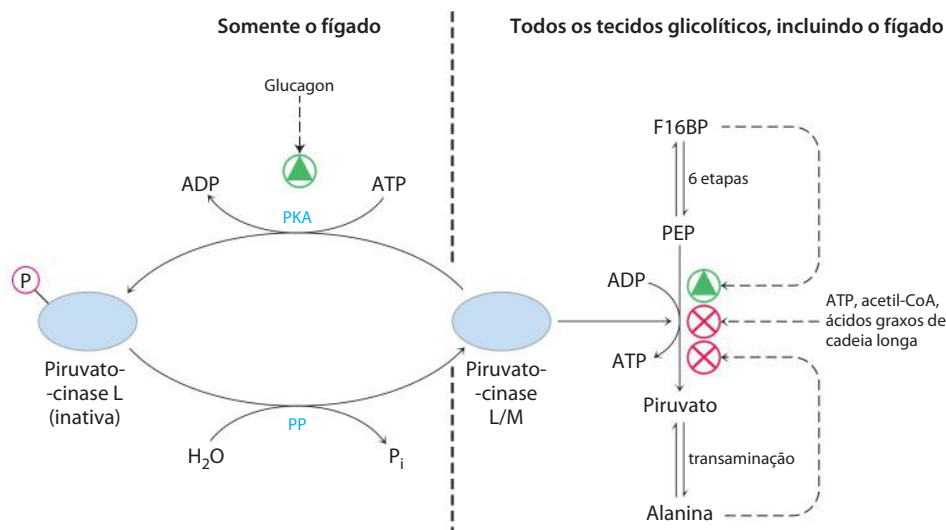



**FIGURA 15-21 Regulação da piruvato-cinase.** A enzima é inibida alostericamente por ATP, acetil-CoA e ácidos graxos de cadeia longa (sinais de um suprimento abundante de energia), e o acúmulo de frutose-1,6-bifosfato desencadeia sua ativação. O acúmulo de alanina, que é sintetizada a partir do piruvato em uma única etapa, inibe alostericamente a piruvato-cinase, reduzindo a velocidade de produção de piruvato na glicólise. A isoenzima do fígado (forma L) também é regulada hormonalmente. O glucagon ativa a proteína-cinase dependente de AMP cíclico (PKA; ver Figura 15-37), que fosforila a isoenzima L da piruvato-cinase, inativando-a. Quando os níveis de glucagon diminuem, uma proteína-fosfatase (PP) desfosforila a piruvato-cinase, ativando-a. Este mecanismo impede que o fígado degrade glicose pela glicólise quando a glicose sanguínea estiver baixa; em vez disso, o fígado exporta glicose. A isoenzima do músculo (forma M) não é afetada por esse mecanismo de fosforilação.

sa a liberação de glucagon, a proteína-cinase dependente de cAMP fosforila a isoenzima L, inativando-a. Isso causa uma redução no uso da glicose como combustível no fígado, poupando-a para exportá-la para o cérebro e outros órgãos. No músculo, o efeito do aumento da [cAMP] é bem diferente. Em resposta à adrenalina, o cAMP ativa a degradação do glicogênio e a glicólise e fornece o combustível necessário para a resposta de luta ou fuga.

## A conversão gliconeogênica do piruvato a fosfoenolpiruvato está sob múltiplos tipos de regulação

Na via de piruvato a glicose, o primeiro ponto de controle determina o destino do piruvato na mitocôndria: sua conversão em acetil-CoA (pelo complexo da piruvato-desidrogenase) para suprir o ciclo do ácido cítrico (Capítulo 16) ou em oxaloacetato (pela piruvato-carboxilase) para iniciar o processo de gliconeogênese (**Figura 15-22**). Quando os ácidos graxos estão disponíveis como combustíveis, sua degradação nas mitocôndrias do fígado gera acetil-CoA, sinal de que não é necessária oxidação adicional de glicose para combustível. A acetil-CoA é um modulador alostérico positivo da piruvato-carboxilase e negativo da piruvato-desidrogenase, por meio de uma proteína-cinase que inativa a desidrogenase. Quando as necessidades energéticas da célula estão satisfeitas, a fosforilação oxidativa é reduzida, a concentração de NADH aumenta em relação à de $NAD^+$ e inibe o ciclo do ácido cítrico, e a acetil-CoA se acumula. A concentração aumentada da acetil-CoA inibe o complexo da piruvato-desidrogenase, diminuindo a formação de acetil-CoA a partir de piruvato, e estimula a gliconeogênese pela ativação da piruvato-carboxilase, permitindo a conversão do excesso de piruvato em oxaloacetato (e no final, em glicose).

O oxaloacetato assim formado é convertido em fosfoenolpiruvato (PEP) na reação catalisada pela PEP-carboxicinase (Figura 15-13). Nos mamíferos, a regulação dessa enzima-chave ocorre principalmente no nível de sua síntese e degradação, em resposta a sinais hormonais e dietéticos. O jejum ou níveis elevados de glucagon agem por meio do cAMP para aumentar a taxa de transcrição e estabilizar o mRNA. A insulina e a glicose sanguínea alta têm efeitos opostos. Discute-se adiante a regulação transcricional com mais detalhes. Essas mudanças, geralmente desencadeadas por um sinal de fora da célula (dieta, hormônios), acontecem em escala de tempo de minutos ou horas.

**FIGURA 15-22 Dois destinos alternativos para o piruvato.** O piruvato pode ser convertido em glicose e glicogênio via gliconeogênese, ou oxidado a acetil-CoA para a produção de energia. A primeira enzima de cada via é regulada alostericamente; a acetil-CoA, produzida tanto pela oxidação dos ácidos graxos como pelo complexo da piruvato-desidrogenase, estimula a piruvato-carboxilase e inibe a piruvato-desidrogenase.

## A regulação transcricional da glicólise e da gliconeogênese altera o número de moléculas das enzimas

A maioria das ações reguladoras discutidas até agora é mediada por mecanismos rápidos e reversíveis: efeitos alostéricos, alterações covalentes (fosforilação) da enzima, ou ligação a uma proteína reguladora. Outro conjunto de processos reguladores envolve alterações no número de moléculas de uma enzima na célula por meio de mudanças no equilíbrio entre síntese e degradação da enzima, e a discussão a seguir vai tratar da regulação da transcrição por meio de fatores de transcrição ativados por sinais.

No Capítulo 12 encontram-se receptores nucleares e fatores de transcrição no contexto da sinalização por insulina. Esse hormônio age por meio de seu receptor na membrana plasmática para ativar pelo menos duas vias de sinalização distintas, cada uma envolvendo a ativação de uma proteína-cinase. A MAP-cinase ERK, por exemplo, fosforila os fatores de transcrição SRF e Elk1 (ver Figura 12-15), os quais estimulam a síntese de enzimas necessárias para o crescimento e a divisão celular. A proteína-cinase B (PKB, também chamada de Akt) fosforila outro conjunto de fatores de transcrição (p. ex., PDX1), que estimulam a síntese de enzimas que metabolizam carboidratos e as gorduras que se formam e são armazenadas em consequência de um excesso de ingestão de carboidratos. Nas células $\beta$ pancreáticas, a PDX1 também estimula a síntese da própria insulina.

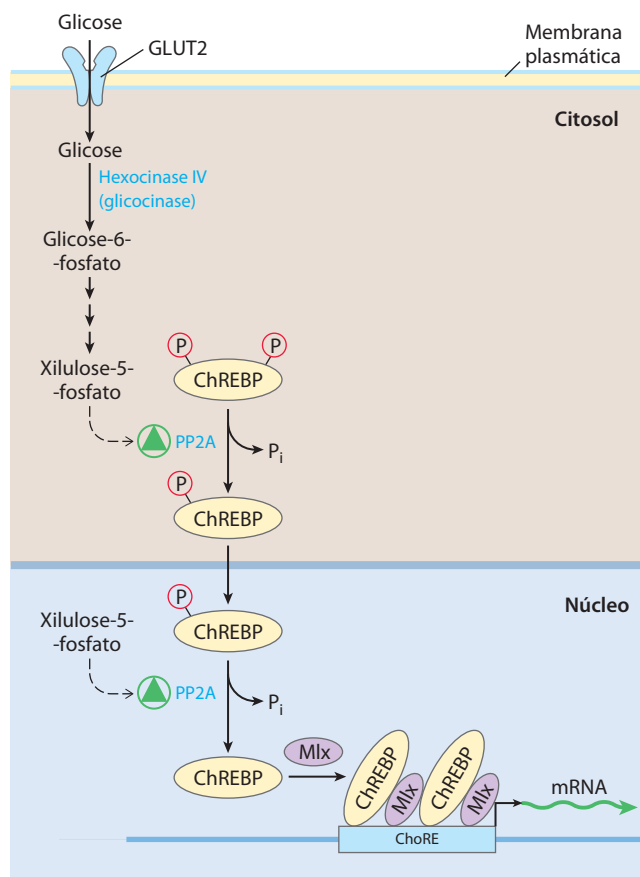
Mais de 150 genes são regulados pela insulina; os humanos têm, pelo menos, sete tipos gerais de elementos de resposta à insulina, cada um deles reconhecido por um subconjunto de fatores de transcrição ativados pela insulina sob condições variadas. A insulina estimula a transcrição dos genes que codificam as hexocinases II e IV, a PFK-1, a piruvato-cinase e a PFK-2/FBPase-2 (todas envolvidas na glicólise e na sua regulação); várias enzimas da síntese dos ácidos graxos; a glicose-6-fosfato-desidrogena-

**TABELA 15-5** Alguns dos genes regulados pela insulina

| Alteração na expressão gênica | Via |
|---|---|
| **Expressão aumentada** | |
| Hexocinase II | Glicólise |
| Hexocinase IV | Glicólise |
| Fosfofrutocinase I (PFK-1) | Glicólise |
| Piruvato-cinase | Glicólise |
| PFK-2/FBPase-2 | Regulação da glicólise/gliconeogênese |
| Glicose-6-fosfato-desidrogenase | Via das pentoses-fosfato (NAPDH) |
| 6-Fosfogliconato-desidrogenase | Via das pentoses-fosfato (NAPDH) |
| Piruvato-desidrogenase | Síntese dos ácidos graxos |
| Acetil-CoA-carboxilase | Síntese dos ácidos graxos |
| Enzima málica | Síntese dos ácidos graxos (NADPH) |
| ATP-citrato-liase | Síntese dos ácidos graxos (fornece acetil-CoA) |
| Complexo sintase de ácidos graxos | Síntese dos ácidos graxos |
| Estearoil-CoA-desidrogenase | Insaturação dos ácidos graxos |
| Acil-CoA-glicerol-transferases | Síntese de triacilglicerol |
| **Expressão reduzida** | |
| PEP-carboxicinase | Gliconeogênese |
| Glicose-6-fosfatase (subunidade catalítica) | Glicose liberada para o sangue |

se e a 6-fosfogliconato-desidrogenase, que são enzimas da via das pentoses-fosfato que geram o NADPH requerido para a síntese dos ácidos graxos. A insulina também reduz a expressão dos genes que codificam duas enzimas da gliconeogênese: PEP-carboxicinase e glicose-6-fosfatase (Tabela 15-5).

Um fator de transcrição importante para o metabolismo dos carboidratos é a **ChREBP** (**proteína de ligação ao elemento de resposta aos carboidratos**, de ***C****ar*-*bo****h****ydrate* ***R****esponse* ***E****lement* ***B****inding* ***P****rotein*; **Figura 15-23**), expressada principalmente no fígado, no tecido adiposo e no rim. Ela serve para coordenar a síntese das enzimas necessárias na síntese dos carboidratos e das gorduras. ChREBP, no seu estado inativo, é fosforilada e se localiza no citosol. Quando a fosfoproteína-fosfatase PP2A (Figura 15-20) remove o grupo fosforil do ChREBP, o fator de transcrição pode entrar no núcleo. Ali, uma PP2A nuclear remove outro grupo fosforil, e o fator se liga a uma proteína, Mlx, ativando a síntese de várias enzimas: piruvato-cinase, ácido graxo-sintase e acetil-CoA-carboxilase, a primeira enzima da via de síntese dos ácidos graxos.

**FIGURA 15-23 Mecanismo de regulação gênica pelo fator de transcrição ChREBP.** Quando um fator ChREBP é fosforilado em um resíduo de Ser e um de Thr, no citosol de um hepatócito, ele não pode entrar no núcleo. A desfosforilação de Ⓟ-Ser pela proteína-fosfatase PP2A permite que ChREBP entre no núcleo, onde uma segunda desfosforilação, de Ⓟ-Thr, ativa o fator, de forma que ele consiga se associar com a proteína Mlx. ChREBP-Mlx se liga agora ao elemento de resposta aos carboidratos (ChoRE) no promotor e estimula a transcrição. PP2A é ativada alostericamente pela xilulose-5-fosfato, um intermediário da via das pentoses-fosfato.

A xilulose-5-fosfato que controla a atividade da PP2A – e, assim, forma basicamente a síntese desse grupo de enzimas metabólicas – é um intermediário da via das pentoses-fosfato (Figura 14-23). Quando a concentração da glicose no sangue está alta, ela entra no fígado e é fosforilada pela hexocinase IV. A glicose-6-fosfato assim formada pode entrar ou na via glicolítica ou na via das pentoses-fosfato. Nesta última, duas oxidações iniciais produzem a xilulose-5-fosfato, a qual serve como um sinal de que as vias de utilização da glicose estão bem supridas de substrato. Isso é obtido pela ativação alostérica da PP2A, a qual desfosforila a ChREBP, permitindo ao fator de transcrição a ativação de genes das enzimas da glicólise e da síntese de gorduras (Figura 15-23). A glicólise gera piruvato, e a conversão do piruvato em acetil-CoA fornece o material de partida para a síntese dos ácidos graxos: a acetil-CoA-carboxilase converte acetil-CoA em malonil-CoA, o primeiro intermediário comprometido com a via de síntese dos ácidos graxos. O complexo da ácido graxo-sintase produz ácidos graxos que são exportados para o tecido adiposo e armazenados na forma de triacilgliceróis (Capítulo 21). Dessa maneira, o excesso de carboidrato da dieta é armazenado como gordura.

Outro fator de transcrição no fígado, **SREBP-1c**, membro da família das **proteínas de ligação ao elemento regulador dos esteróis** (SREBP, de ***S****terol* ***R****egulatory* ***E****lement* ***B****inding* ***P****rotein)* (ver Figura 21-44), ativa a síntese da piruvato-cinase, hexocinase IV, lipase lipoproteica, acetil-CoA-carboxilase, e do complexo da ácido graxo-sintase que converte a acetil-CoA (produzida a partir do piruvato) em ácidos graxos para o armazenamento nos adipócitos. A síntese da SREBP-1c é estimulada pela insulina e inibida pelo glucagon. A SREBP-1c também reprime a expressão de várias enzimas gliconeogênicas: glicose-6-fosfatase, PEP-carboxicinase e FBPase-1.

O fator de transcrição **CREB** (**proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP**, de ***C****yclic AMP* ***R****esponse* ***E****lement* ***B****inding protein*) ativa a síntese da glicose-6-fosfatase e da PEP-carboxicinase em resposta ao aumento da [cAMP] desencadeado pelo glucagon. Em contrapartida, a *inativação* de outros fatores de transcrição estimulada pela insulina inibe a síntese de várias enzimas gliconeogênicas no fígado: PEP-carboxicinase, frutose-1,6-bifosfatase, transportador da glicose-6-fosfato do retículo endoplasmático e a glicose-6-fosfatase. Por exemplo, **FOXO1** (**de *forkhead box other***) estimula a síntese das enzimas gliconeogênicas e reprime a síntese das enzimas da glicólise, da via das pentoses-fosfato e da síntese dos triacilgliceróis (**Figura 15-24**). Na sua forma não fosforilada, FOXO1 age como um fator de transcrição nuclear. Em resposta à insulina, esse fator deixa o núcleo e, no citosol, é fosforilado pela PKB, sendo marcado com ubiquitina e degradado no proteassomo. O glucagon impede a fosforilação pela PKB, e FOXO1 permanece ativo no núcleo.

Embora os processos descritos anteriormente pareçam complicados, a regulação dos genes que codificam as enzimas do metabolismo dos carboidratos e das gorduras vem a ser muito mais complexa e aprimorada do que aparece aqui. Múltiplos fatores de transcrição podem agir sobre um mesmo promotor; múltiplas proteínas-cinases e fosfatases podem ativar ou inativar estes fatores; e uma grande variedade de fatores acessórios proteicos modula a atividade dos fatores de transcrição. Essa complexidade pode ser evidenciada, por exemplo, no gene que codifica a PEP-carboxicinase, um caso de controle transcricional muito bem estudado. Sua região promotora (**Figura 15-25**) tem mais de 15 elementos de resposta que são reconhecidos por, pelo menos, uma dúzia de fatores de transcrição conhecidos, e com provavelmente mais a serem descobertos. Os fatores de transcrição agem em associação sobre esta região promotora, e em centenas de outros promotores, para regular de forma mais exata os níveis de centenas de enzimas metabólicas, coordenando suas atividades no metabolismo dos carboidratos e das gorduras. A importância crucial dos fatores de transcrição na regulação metabólica se torna clara pela observação dos efeitos de mutações nesses genes. Por exemplo, pelo menos cinco tipos diferentes de diabetes juvenil iniciado na maturidade (MODY, de ***M****aturity*-***O****nset* ***D****iabetes of the* ***Y****oung*) são associados com mutações em fatores de transcrição específicos (Quadro 15-3).

**FIGURA 15-24 Mecanismo de regulação gênica pelo fator de transcrição FOXO1.** A insulina ativa a cascata de sinalização mostrada na Figura 12-16, levando à ativação da proteína-cinase B (PKB). FOXO1 é fosforilado pela PKB no citosol, e o fator fosforilado é marcado, pela adição de ubiquitinas, para degradação no proteassomo. O FOXO1 que permanece não fosforilado ou que é desfosforilado, entra no núcleo, se liga a um elemento de resposta, e desencadeia a transcrição dos genes associados. Por isso a insulina tem o efeito de "desligar" a expressão destes genes, os quais incluem a PEP-carboxicinase e a glicose-6-fosfatase.

**FIGURA 15-25 A região promotora do gene da PEP-carboxicinase, mostrando a complexidade da regulação deste gene.** Este diagrama mostra os fatores de transcrição (os ícones menores, ligados ao DNA) relacionados com a regulação da transcrição do gene da PEP-carboxicinase. O nível de expressão deste gene depende de sinais combinados que afetam todos estes fatores, que podem refletir a disponibilidade de nutrientes, o nível de glicose sanguínea, e outras circunstâncias que afetam a necessidade da célula por esta enzima em um período em particular. P1, P2, P3I, P3II e P4 são sítios de ligação a proteínas, identificados por *footprinting* com DNase I (ver Quadro 26-1). A TATA-*box* é o ponto de montagem do complexo de transcrição da RNA-polimerase II (Pol II).

## QUADRO 15-3  MEDICINA Mutações genéticas que originam formas raras de diabetes

O termo "diabetes" descreve grande variedade de condições clínicas que têm em comum a produção excessiva de urina. O Quadro 11-2 descreve o diabetes insípido, no qual a reabsorção defectiva de água pelos rins é resultado de uma mutação no gene da aquaporina. "Diabetes melito" se refere especificamente à doença na qual a metabolização da glicose está comprometida, seja devido à incapacidade do pâncreas de produzir insulina ou à resistência dos tecidos à ação da insulina.

Existem dois tipos comuns de diabetes melito. O tipo 1, também chamado de diabetes melito dependente de insulina (IDDM, de ***i****nsulin*-***d****ependent* ***d****iabetes* ***m****ellitus*), é causado por um ataque autoimune às células β pancreáticas produtoras de insulina. As pessoas com IDDM devem usar insulina injetável ou por inalação para compensar a perda das células β. O IDDM se desenvolve na infância ou na adolescência; um nome mais antigo da doença é diabetes juvenil. O tipo 2, também chamado de diabetes melito não dependente de insulina (NIDDM, de ***n****on*-***i****nsulin*-***d****ependent* ***d****iabetes* ***m****ellitus*), se desenvolve em adultos com mais de 40 anos. É muito mais comum do que o IDDM, e sua ocorrência na população está fortemente relacionada com a obesidade. A atual epidemia de obesidade nos países mais desenvolvidos traz com ela o presságio de uma epidemia de NIDDM, proporcionando um forte incentivo para o estudo das relações entre a obesidade e o desencadeamento do NIDDM nos níveis genético e bioquímico. Após completar o exame do metabolismo das gorduras e das proteínas nos últimos capítulos, o Capítulo 23 retoma a discussão do diabetes, que tem um amplo efeito no metabolismo dos carboidratos, das gorduras e das proteínas.

Aqui será estudado outro tipo de diabetes no qual o metabolismo dos carboidratos e das gorduras está alterado: diabetes juvenil com início na maturidade (MODY), no qual uma mutação genética afeta um fator de transcrição importante na transmissão do sinal da insulina para o núcleo, ou afeta uma enzima que responde à in-

*(Continua na próxima página)*

**QUADRO 15-3**  **MEDICINA** **Mutações genéticas que originam formas raras de diabetes (*Continuação*)**

sulina. No MODY2, uma mutação no gene da hexocinase IV (glicocinase) afeta o fígado e o pâncreas, órgãos nos quais esta é a principal isoforma da hexocinase. A glicocinase das células $\beta$ pancreáticas funciona como sensor de glicose. Normalmente, quando a glicose sanguínea aumenta, aumentam também seus níveis nas células $\beta$, sendo que, uma vez que a glicocinase tem um $K_m$ relativamente alto para a glicose, sua atividade aumenta com a elevação dos níveis de glicose no sangue. O metabolismo da glicose-6-fosfato formada nessa reação eleva o nível de ATP nas células $\beta$, e isso causa a liberação de insulina pelo mecanismo mostrado na Figura 23-27. Em pessoas sadias, a concentração sanguínea de glicose de ~5 mM causa essa liberação do hormônio, mas pessoas com mutações inativantes em ambas as cópias do gene da glicocinase têm limiares muito altos para a liberação da insulina, e em consequência apresentam hiperglicemia severa desde o nascimento – diabetes neonatal permanente. Em pessoas com uma cópia mutada e uma normal, o limiar de glicose para a liberação da insulina se eleva para cerca de 7 mM. Essas pessoas têm níveis de glicose sanguínea ligeiramente acima do normal: elas geralmente têm hiperglicemia leve e não apresentam outros sintomas. Essa condição (MODY2) geralmente é descoberta por acaso durante análise rotineira de glicose sanguínea.

Existem pelo menos outros cinco tipos de MODY, cada um deles como resultado de mutações inativantes em algum dos fatores de transcrição essenciais para o desenvolvimento normal e a função das células $\beta$ pancreáticas. As pessoas com essas mutações apresentam redução na produção de insulina e os defeitos associados à homeostasia da glicose sanguínea em graus variados. Em MODY1 e MODY3, os defeitos são suficientemente graves para produzir as complicações de longo prazo associadas com IDDM e NIDDM – problemas cardiovasculares, insuficiência renal e cegueira. MODY4, 5 e 6 são formas menos graves da doença. Em conjunto, as doenças MODY representam uma pequena porcentagem de casos de NIDDM. Pessoas com mutações no próprio gene da insulina também são casos muito raros; elas apresentam defeitos de gravidade variada na sinalização da insulina.

### RESUMO 15.3 Regulação coordenada da glicólise e da gliconeogênese

- A gliconeogênese e a glicólise compartilham sete enzimas que catalisam as reações livremente reversíveis das vias. Nas outras três etapas, a reação direta e a inversa são catalisadas por enzimas diferentes, e esses são os pontos de regulação das duas vias.
- A hexocinase IV (glicocinase) tem propriedades cinéticas relacionadas com seu papel especial no fígado: liberar glicose para o sangue quando a glicose sanguínea está baixa, além de captar e metabolizar a glicose quando ela estiver alta no sangue.
- A PFK-1 é inibida alostericamente por ATP e citrato. Na maioria dos tecidos dos mamíferos, incluindo o fígado, a frutose-2,6-bifosfato é um ativador alostérico dessa enzima.
- A piruvato-cinase é inibida alostericamente por ATP, e a isoenzima do fígado também é inibida por fosforilação dependente de cAMP.
- A gliconeogênese é regulada no nível da piruvato-carboxilase (ativada por acetil-CoA) e da FBPase-1 (inibida por frutose-2,6-bifosfato e AMP).
- Para limitar a alternância de substrato entre a glicólise e a gliconeogênese, as duas vias estão sob controle alostérico recíproco, obtido principalmente pelos efeitos opostos da frutose-2,6-bifosfato sobre a PFK-1 e a FBPase-1.
- O glucagon ou a adrenalina reduzem a [frutose-2,6-bifosfato] pela elevação da [cAMP] e promoção da fosforilação da enzima bifuncional PFK-2/FBPase-2. A insulina aumenta a [frutose-2,6-bifosfato] pela ativação da fosfoproteína-fosfatase que desfosforila e assim ativa a PFK-2.
- A xilulose-5-fosfato, um intermediário da via das pentoses-fosfato, ativa a fosfoproteína-fosfatase PP2A, que desfosforila várias proteínas-alvo, incluindo PFK-2/FBPase-2, deslocando o equilíbrio no sentido da captação de glicose, síntese de glicogênio e síntese de lipídeos no fígado.
- Os fatores de transcrição ChREBP, CREB, SREBP e FOXO1 agem no núcleo, na regulação da expressão de genes específicos que codificam enzimas das vias glicolítica e gliconeogênica. A insulina e o glucagon atuam antagonicamente na ativação desses fatores, ligando e desligando, dessa forma, um grande número de genes.

## 15.4 Metabolismo do glicogênio nos animais

A presente discussão sobre a regulação metabólica, usando o metabolismo dos carboidratos como principal exemplo, aborda agora a síntese e a degradação do glicogênio. Esta seção focaliza as vias metabólicas; a Seção 15.5 aborda os mecanismos reguladores.

Nos organismos, desde as bactérias até as plantas e os vertebrados, o excesso de glicose é convertido em formas poliméricas de armazenamento – glicogênio nos vertebrados e em muitos microrganismos, amido nas plantas. Nos vertebrados, o glicogênio é encontrado principalmente no fígado e no músculo esquelético, podendo representar até 10% do peso do fígado e 1 a 2% do peso do músculo. Se toda essa glicose fosse dissolvida no citosol de um hepatócito, sua concentração seria de cerca de 0,4 M, suficiente para influenciar nas propriedades osmóticas da célula. Quando armazenada na forma de um grande polímero (glicogênio),

**FIGURA 15-26 Grânulos de glicogênio em um hepatócito.** O glicogênio, a forma de armazenamento de carboidratos, aparece como partículas eletrodensas, geralmente na forma de agregados ou rosetas. Nos hepatócitos, o glicogênio está intimamente associado com os túbulos do retículo endoplasmático liso. Muitas mitocôndrias também são evidentes nesta micrografia.

contudo, a mesma massa de glicose tem uma concentração de apenas 0,01 $\mu$M. O glicogênio é armazenado em grandes grânulos citosólicos. A partícula básica do glicogênio, a partícula $\beta$, tem um diâmetro de cerca de 21 nm e consiste em 55.000 resíduos de glicose com cerca de 2.000 extremidades não redutoras. De 20 a 40 dessas partículas se agrupam para formar as rosetas $\alpha$, facilmente visíveis ao microscópio em amostras de tecidos de animais bem alimentados (**Figura 15-26**), mas que desaparecem após um jejum de 24 horas.

O glicogênio do músculo fornece uma fonte de energia rápida para o metabolismo aeróbio e anaeróbio. O glicogênio muscular pode ser gasto em menos de uma hora durante atividade intensa. O glicogênio hepático serve como um reservatório de glicose para os outros tecidos quando não há glicose disponível (entre as refeições ou no jejum); isto é especialmente importante para os neurônios do cérebro, que não podem usar ácidos graxos como combustível. O glicogênio do fígado pode ser exaurido de 12 a 24 horas. Nos humanos, a quantidade total de energia armazenada na forma de glicogênio é muito menor do que a quantidade armazenada como gordura (triacilglicerol) (ver Tabela 23-5), mas as gorduras, nos mamíferos, não podem ser convertidas em glicose e não podem ser metabolizadas anaerobiamente.

Os grânulos de glicogênio são agregados complexos de glicogênio mais as enzimas que os sintetizam e os degradam, assim como a maquinaria de regulação dessas enzimas. Os mecanismos gerais de armazenamento e mobilização do glicogênio são os mesmos no músculo e no fígado, mas as enzimas diferem em aspectos sutis, mas importantes, que refletem os papéis diferentes do glicogênio nesses dois tecidos. O glicogênio também é obtido da dieta e degradado no intestino, e isso envolve um conjunto separado de enzimas hidrolíticas que convertem glicogênio em glicose livre. (O amido da dieta é hidrolisado de forma semelhante.) A presente discussão se inicia com a degradação do glicogênio em glicose-1-fosfato (**glicogenólise**) e em seguida aborda a sua síntese (**glicogênese**).

## A degradação do glicogênio é catalisada pela glicogênio-fosforilase

No músculo esquelético e no fígado, as unidades de glicose das ramificações externas do glicogênio entram na via glicolítica pela ação de três enzimas: glicogênio-fosforilase, enzima de desramificação do glicogênio e fosfoglicomutase. A glicogênio-fosforilase catalisa a reação na qual uma ligação glicosídica ($\alpha$1→4) entre dois resíduos de glicose em uma extremidade não redutora do glicogênio é atacada por um fosfato inorgânico ($P_i$), removendo o resíduo terminal na forma de **$\alpha$-D-glicose-1-fosfato** (**Figura 15-27**). Essa

Extremidade não redutora

Cadeia de glicogênio $(\text{glicose})_n$

$P_i$ Glicogênio-fosforilase

Extremidade não redutora

Glicose-1-fosfato

Glicogênio com um resíduo de glicose a menos $(\text{glicose})_{n-1}$

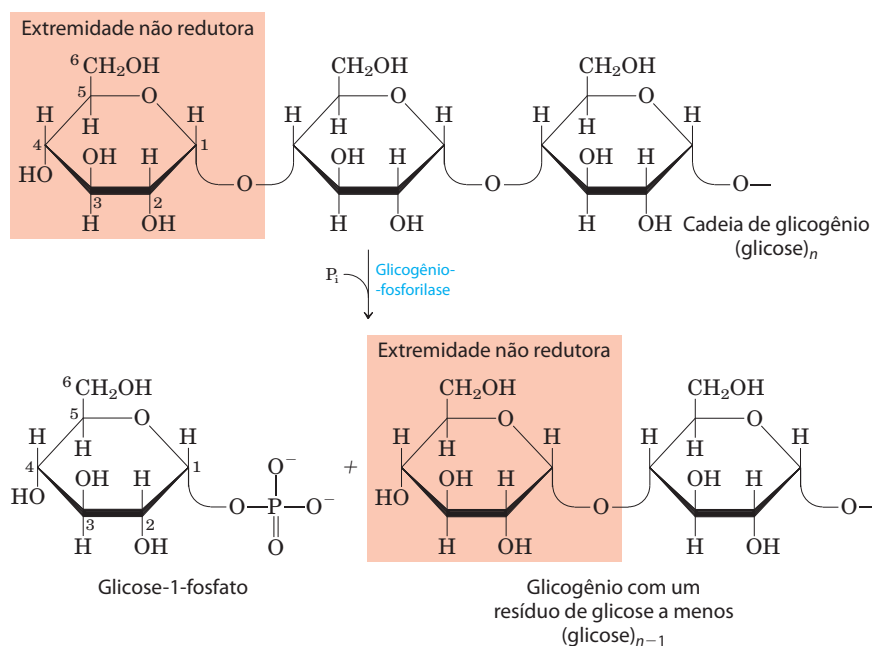



**FIGURA 15-27 Remoção, pela glicogênio-fosforilase, de um resíduo de glicose da extremidade não redutora de uma cadeia de glicogênio.** Este processo é repetitivo; a enzima remove sucessivos resíduos de glicose até que alcance a quarta unidade de glicose antes de um ponto de ramificação (ver Figura 15-28).

reação de *fosforólise* é diferente da *hidrólise* das ligações glicosídicas pela amilase durante a degradação intestinal do glicogênio e do amido da dieta. Na fosforólise, parte da energia da ligação glicosídica é preservada pela formação do éster de fosfato, glicose-1-fosfato (ver Seção 14.2).

O piridoxal-fosfato é um cofator essencial na reação da glicogênio-fosforilase; seu grupo fosfato atua como catalisador ácido geral, promovendo o ataque pelo $P_i$ sobre a ligação glicosídica. (Esse papel do piridoxal-fosfato é incomum; seu papel mais característico é o de cofator no metabolismo dos aminoácidos; ver Figura 18-6.)

A glicogênio-fosforilase age repetidamente sobre as extremidades não redutoras das ramificações do glicogênio até que alcance um ponto a quatro resíduos de glicose de um ponto de ramificação ($\alpha$1→6) (ver Figura 7-13), onde interrompe sua ação. A degradação pela glicogênio-fosforilase continua somente depois que a **enzima de desramificação**, conhecida formalmente como **oligo ($\alpha$1→6) a ($\alpha$1→4) glican-transferase**, catalisa duas reações sucessivas que removem as ramificações (**Figura 15-28**). Logo que as ramificações são removidas e o resíduo glicosil na posição C-6 é hidrolisado, a atividade da glicogênio-fosforilase pode continuar.

**FIGURA 15-28 Degradação do glicogênio próximo a um ponto de ramificação ($\alpha$1→6).** Seguindo-se à remoção sequencial dos resíduos terminais de glicose pela glicogênio-fosforilase (ver Figura 15-27), os resíduos próximos a uma ramificação são removidos por um processo em duas etapas que requer a enzima de desramificação bifuncional. Na primeira, a atividade de transferase da enzima remove um bloco de três resíduos de glicose da ramificação para uma extremidade não redutora próxima, à qual é religado por uma ligação ($\alpha$1→4). O resíduo remanescente no ponto de ramificação, em ligação ($\alpha$1→6), é então liberado como glicose livre pela atividade de glicosidase ($\alpha$1→6) da enzima de desramificação. Os resíduos de glicose são mostrados na forma condensada que omite os grupos —H, —OH e —$CH_2$OH dos anéis piranosídicos.

## A glicose-1-fosfato pode entrar na glicólise ou, no fígado, repor a glicose sanguínea

A glicose-1-fosfato, o produto final da reação da glicogênio-fosforilase, é convertida em glicose-6-fosfato pela **fosfoglicomutase**, que catalisa a reação reversível

$$\text{Glicose-1-fosfato} \rightleftharpoons \text{glicose-6-fosfato}$$

A enzima, inicialmente fosforilada em um resíduo de Ser, doa um grupo fosforil ao C-6 do substrato e aceita um grupo fosforil do C-1 (**Figura 15-29**).

A glicose-6-fosfato formada no músculo esquelético a partir do glicogênio pode entrar na glicólise e serve como fonte de energia para a contração muscular. No fígado, a degradação do glicogênio serve a um propósito diferente: liberar glicose para o sangue quando o nível de glicose sanguínea diminui, como acontece entre as refeições. Isso requer

**FIGURA 15-29 A reação catalisada pela fosfoglicomutase.** A reação começa com a enzima fosforilada em um resíduo de Ser. Na etapa ❶, a enzima doa seu grupo fosforil (em azul) para a glicose-1-fosfato, produzindo glicose-1-6-bifosfato. Na etapa ❷, o grupo fosforil no C-1 da glicose-1-6-bifosfato (em vermelho) é transferido de volta para a enzima, restaurando a fosfoenzima e produzindo glicose-6-fosfato.

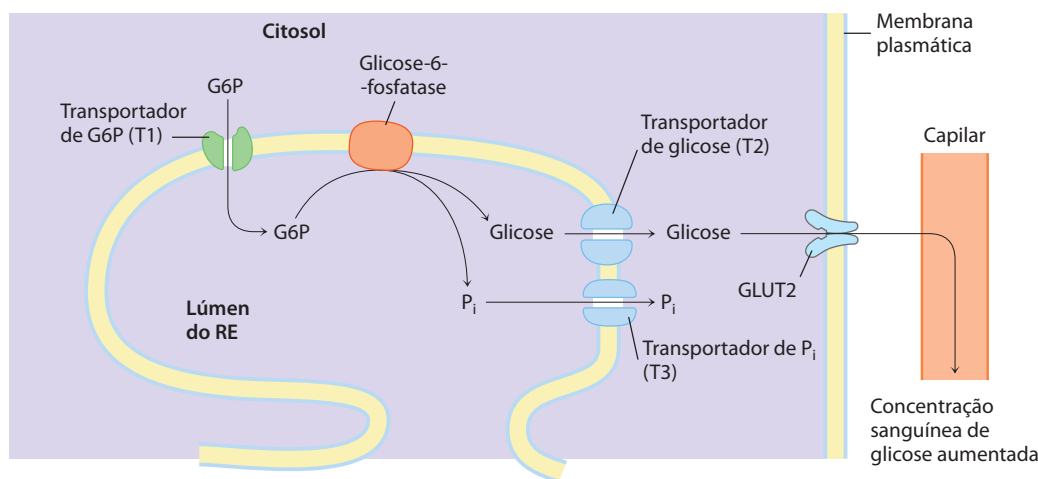



**FIGURA 15-30 Hidrólise da glicose-6-fosfato pela glicose 6-fosfatase do retículo endoplasmático (RE).** O sítio catalítico da glicose-6--fosfatase está voltado para o lúmen do RE. Um transportador (T1) de glicose-6-fosfato (G6P) leva o substrato do citosol para o lúmen, e os produtos, glicose e $P_i$, passam para o citosol por meio de transportadores específicos (T2 e T3). A glicose deixa a célula via transportador GLUT2 da membrana plasmática.

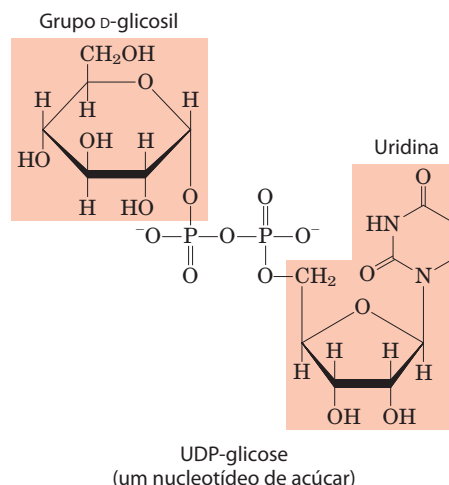
a presença da enzima glicose-6-fosfatase no fígado e no rim, mas não em outros tecidos. A enzima é uma proteína integral da membrana do retículo endoplasmático, contendo, preditivamente, nove hélices transmembrana, com seu sítio ativo no lado lumenal do retículo. A glicose-6-fosfato formada no citosol é transportada para o lúmen do retículo por um transportador específico (T1) (**Figura 15-30**) e hidrolisada na superfície lumenal pela glicose-6-fosfatase. Acredita-se que os produtos resultantes, $P_i$ e glicose, sejam transportados de volta para o citosol por dois transportadores diferentes (T2 e T3), e a glicose deixa o hepatócito pelo transportador GLUT2 na membrana plasmática. Observe que, por ter o sítio ativo da enzima no lúmen do retículo, a célula separa essa reação do processo de glicólise que acontece no citosol e poderia ser abortado pela ação da glicose-6-fosfatase. Defeitos genéticos na glicose-6-fosfatase ou no T1 levam a perturbações sérias no metabolismo do glicogênio, resultando na doença de depósito de glicogênio tipo Ia (Quadro 15-4).

O músculo e o tecido adiposo não conseguem converter a glicose-6-fosfato formada pela degradação do glicogênio em glicose, pois não têm a enzima glicose-6-fosfatase; por isso, esses tecidos não fornecem glicose para o sangue.

## O nucleotídeo de açúcar UDP-glicose doa glicose para a síntese do glicogênio

Luis Leloir, 1906-1987

Muitas das reações pelas quais as hexoses são transformadas ou polimerizadas envolvem **nucleotídeos de açúcar**, compostos nos quais o carbono anômero do açúcar é ativado pela união a um nucleotídeo por meio de uma ligação éster de fosfato. Os nucleotídeos de açúcar são os substratos para a polimerização de monossacarídeos em dissacarídeos, glicogênio, amido, celulose e polissacarídeos extracelulares mais complexos. Também são intermediários-chave na produção das amino--hexoses e desoxi-hexoses, encontradas em alguns desses polissacarídeos, e na síntese da vitamina C (ácido L-ascórbico). O papel dos nucleotídeos de açúcar na biossíntese do glicogênio e em muitos outros derivados de carboidratos foi descoberto em 1953 pelo bioquímico argentino Luis Leloir.

UDP-glicose
(um nucleotídeo de açúcar)

A adequação dos nucleotídeos de açúcar para as reações biossintéticas tem origem em várias propriedades:

1. Sua formação é metabolicamente irreversível, contribuindo para a irreversibilidade das vias biossintéticas em que são intermediários. A condensação de um nucleosídeo-trifosfato com uma hexose-1-fosfato para formar um nucleotídeo de açúcar tem uma pequena variação de energia livre positiva, mas a reação libera $PP_i$, que é rapidamente hidrolisado pela pirofosfatase inorgânica (**Figura 15-31**), em uma reação fortemente exergônica ($\Delta G'^{\circ}$ = 19,2 kJ/mol). Isso mantém baixa a concentração de $PP_i$, garantindo que, na célula, a variação de energia livre real seja vantajosa. De fato, a remoção rápida do produto, conduzida pela grande variação de energia livre negativa da hidrólise de $PP_i$, impulsiona a reação sintética para

## QUADRO 15-4 Carl e Gerty Cori: pioneiros no metabolismo e nas doenças do armazenamento do glicogênio

Muito do que está escrito nos livros-texto atuais de bioquímica sobre o metabolismo do glicogênio foi descoberto entre 1925 e 1950 pelo admirável casal Carl F. Cori e Gerty T. Cori. Ambos se formaram em medicina na Europa no final da I Guerra Mundial (ela completou os estudos pré-médicos e a escola de medicina em um ano!). Eles deixaram a Europa juntos em 1922 e estabeleceram laboratórios de pesquisa nos Estados Unidos, primeiro por nove anos em Buffalo, Nova York, onde é hoje o Roswell Park Memorial Institute, e de 1931 até o final de suas vidas, na Universidade de Washington, em St. Louis.

Nos seus estudos fisiológicos iniciais sobre a origem e o destino do glicogênio no músculo dos animais, os Cori demonstraram a conversão do glicogênio em lactato no tecido, o deslocamento do lactato pelo sangue para o fígado, e sua reconversão aí em glicogênio – rota que se tornou conhecida como o ciclo de Cori (ver Figura 23-19). Seguindo essas informações no nível bioquímico, o casal mostrou que o glicogênio era mobilizado em uma reação de fosforólise catalisada pela enzima descoberta por eles, a glicogênio-fosforilase. Os Cori identificaram o produto dessa reação (o "éster de Cori") como glicose-1-fosfato e mostraram que esse produto podia ser reincorporado em glicogênio pela reação inversa. Embora isso não provasse que essa era a reação usada pelas células para sintetizar glicogênio, foi a primeira demonstração "*in vitro*" da síntese de uma macromolécula a partir de subunidades monoméricas simples, o que inspirou outros a procurar enzimas polimerizadoras. Arthur Kornberg, descobridor da primeira DNA-polimerase, falou sobre sua experiência no laboratório dos Cori: "Foi a glicogênio-fosforilase, e não o pareamento de bases, que me levou à DNA-polimerase".

Os Cori no laboratório de Gerty Cori, por volta de 1947.

Gerty Cori passou a se interessar por doenças genéticas humanas nas quais o fígado armazenava um excesso de glicogênio. Ela conseguiu identificar o defeito bioquímico de várias dessas doenças e mostrou que elas podiam ser diagnosticadas por meio de testes das enzimas do metabolismo do glicogênio em pequenas amostras de tecidos obtidas por biópsias. A Tabela Q-1 resume o conhecimento atual sobre 13 doenças genéticas desse tipo. ■

Carl e Gerty compartilharam o Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina em 1947 com Bernardo Houssay, da Argentina, que foi premiado por seus estudos sobre a regulação hormonal do metabolismo dos carboidratos. Os laboratórios Cori em St. Louis se tornaram um centro internacional de pesquisa bioquímica nas décadas de 1940 e 1950, e pelo menos seis cientistas que estudaram com os Cori receberam o Nobel: Arthur Kornberg (pela síntese do DNA, 1959), Severo Ochoa (pela síntese do RNA, 1959), Luis Leloir (pelo papel dos nucleotídeos de açúcar na síntese dos polissacarídeos, 1970), Earl Sutherland (pela descoberta do cAMP na regulação do metabolismo dos carboidratos, 1971), Christian de Duve (pelo fracionamento subcelular, 1974) e Edwin Krebs (pela descoberta da fosforilase-cinase, 1991).

a frente, estratégia comum nas reações biológicas de polimerização.

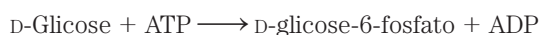
2. Embora as transformações químicas dos nucleotídeos de açúcar não envolvam os átomos do próprio nucleotídeo, essa parte da molécula tem muitos grupos que podem interagir covalentemente com enzimas; a energia livre adicional de ligação pode contribuir de modo significativo para a atividade catalítica (Capítulo 6; ver também p. 306-307).
3. Assim como o fosfato, o grupo nucleotidil (p. ex., UMP ou AMP) é um excelente grupo de fácil eliminação, facilitando o ataque nucleofílico pela ativação do carbono do açúcar ao qual está ligado.
4. Pela "marcação" de algumas hexoses com grupos nucleotidil, as células podem deixá-las confinadas em um reservatório para uma finalidade (p. ex., síntese de glicogênio), separadas das hexoses-fosfato destinadas a outra finalidade (como a glicólise).

A síntese do glicogênio ocorre em quase todos os tecidos animais, mas é mais importante no fígado e no músculo esquelético. O ponto de partida para a síntese do glicogênio

**TABELA Q-1**  Doenças do armazenamento de glicogênio em humanos

| Tipo (nome) | Enzima afetada | Principal órgão afetado | Sintomas |
|---|---|---|---|
| Tipo 0 | Glicogênio-sintase | Fígado | Glicose sanguínea baixa, corpos cetônicos altos, morte prematura |
| Tipo Ia (von Gierke) | Glicose-6-fosfatase | Fígado | Fígado aumentado, insuficiência renal |
| Tipo Ib | Glicose-6-fosfato-translocase microssomal | Fígado | Como em Ia; também suscetibilidade alta a infecções bacterianas |
| Tipo Ic | Transportador microssomal de $P_i$ | Fígado | Como em Ia |
| Tipo II (Pompe) | Glicosidase lisossomal | Músculo cardíaco e esquelético | Forma infantil: morte aos 2 anos; forma juvenil: defeitos musculares (miopatia); forma adulta: como na distrofia muscular |
| Tipo IIIa (Cori ou Forbes) | Enzima de desramificação | Fígado, músculo cardíaco e esquelético | Aumento do fígado em crianças; miopatia |
| Tipo IIIb | Enzima de desramificação hepática (enzima normal no músculo) | Fígado | Aumento do fígado em crianças |
| Tipo IV (Andersen) | Enzima de ramificação | Fígado, músculo esquelético | Fígado e pâncreas aumentados, mioglobina na urina |
| Tipo V (McArdle) | Fosforilase do músculo | Músculo esquelético | Câibras induzidas pelo exercício e dor; mioglobina na urina |
| Tipo VI (Hers) | Fosforilase do fígado | Fígado | Fígado aumentado |
| Tipo VII (Tarui) | PFK-1 do músculo | Músculo, eritrócitos | Como no tipo V; também anemia hemolítica |
| Tipo VIb, VIII ou IX | Fosforilase-cinase | Fígado, leucócitos, músculo | Fígado aumentado |
| Tipo XI (Fanconi-Bickel) | Transportador de glicose (GLUT2) | Fígado | Deficiência no desenvolvimento, fígado aumentado, raquitismo, disfunção renal |

é a glicose-6-fosfato. Como foi visto, esta pode ser derivada da glicose livre em uma reação catalisada pelas isoenzimas hexocinase I e hexocinase II no músculo e hexocinase IV (glicocinase) no fígado:

$$\text{D-Glicose} + \text{ATP} \longrightarrow \text{D-glicose-6-fosfato} + \text{ADP}$$

No entanto, parte da glicose ingerida faz uma via mais indireta para o glicogênio. Ela é captada primeiro pelos eritrócitos e transformada glicoliticamente em lactato, que é captado pelo fígado e convertido em glicose-6-fosfato pela gliconeogênese.

Para iniciar a síntese do glicogênio, a glicose-6-fosfato é convertida em glicose-1-fosfato na reação da fosfoglicomutase:

$$\text{Glicose-6-fosfato} \rightleftharpoons \text{glicose-1-fosfato}$$

O produto desta reação é convertido em UDP-glicose pela ação da **UDP-glicose-pirofosforilase**, em uma etapa fundamental da biossíntese do glicogênio:

$$\text{Glicose-1-fosfato} + \text{UTP} \longrightarrow \text{UDP-glicose} + \text{PP}_i$$

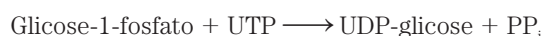
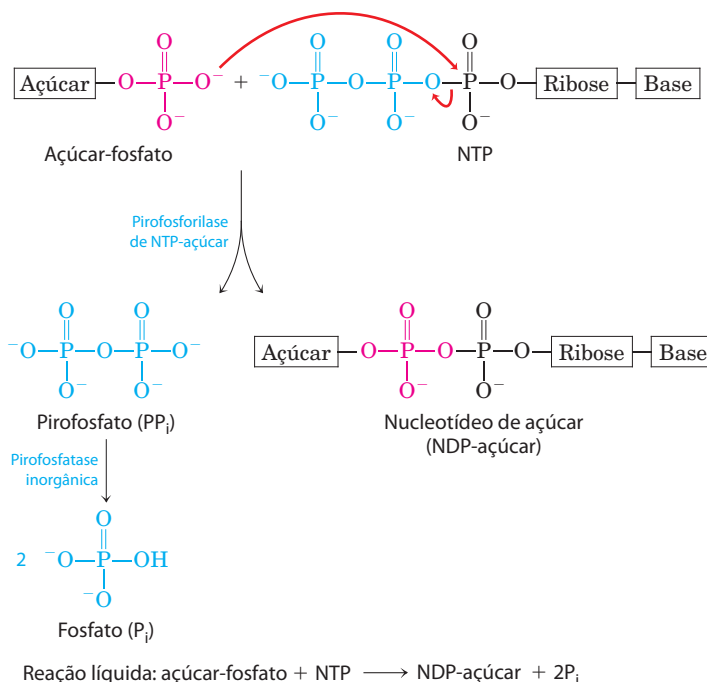



**FIGURA 15-31 Formação de um nucleotídeo de açúcar.** Ocorre uma reação de condensação entre um nucleosídeo-trifosfato (NTP) e um açúcar-fosfato. O oxigênio carregado negativamente no açúcar--fosfato serve como nucleófilo, atacando o fosfato $\alpha$ do nucleosídeo--trifosfato e deslocando pirofosfato. A hidrólise de $PP_i$ pela pirofosfatase inorgânica impulsiona a reação para a frente.



Observe que essa enzima é denominada pela reação inversa; na célula, a reação ocorre no sentido da formação da UDP-glicose, porque o pirofosfato é hidrolisado rapidamente pela pirofosfatase inorgânica (Figura 15-31).

A UDP-glicose é o doador imediato dos resíduos de glicose na reação catalisada pela **glicogênio-sintase**, que promove a transferência da glicose da UDP-glicose para uma extremidade não redutora de uma molécula ramificada de glicogênio (**Figura 15-32**). O equilíbrio total da via desde a glicose-6-fosfato até o glicogênio acrescido de uma unidade de glicose favorece muito a síntese do polímero.

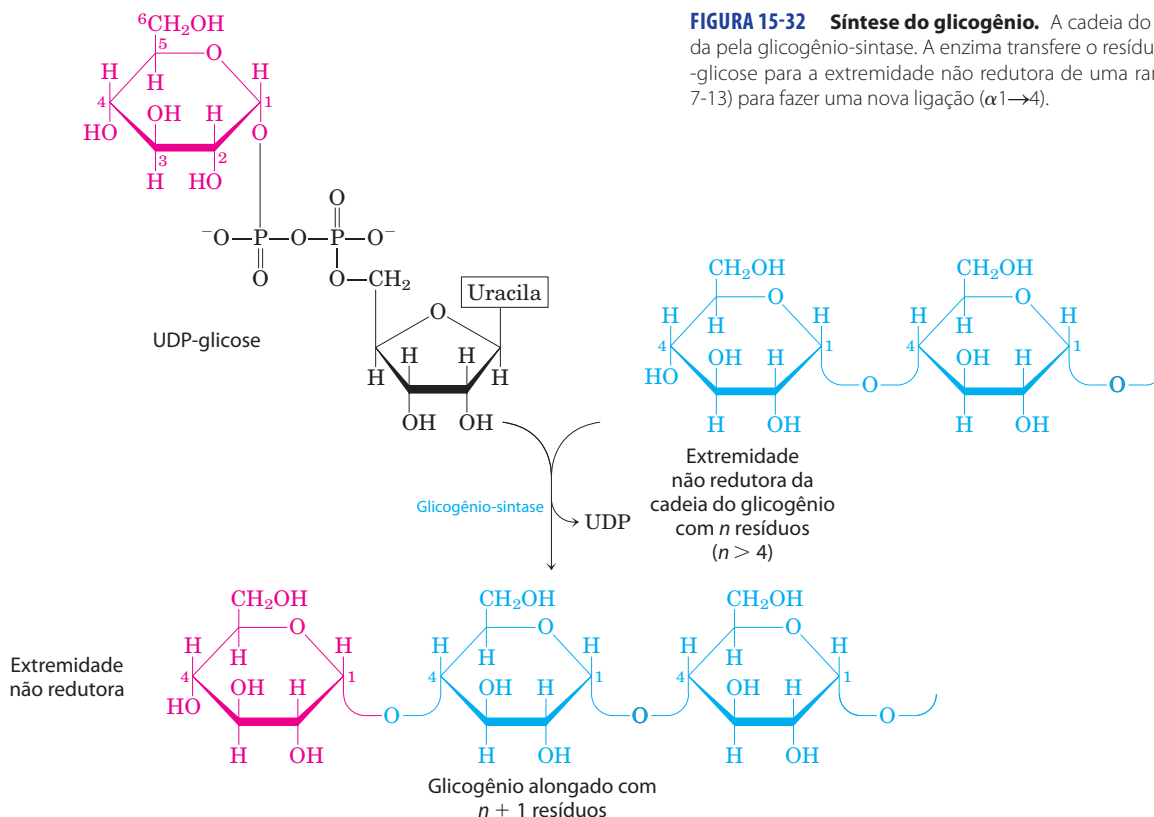



**FIGURA 15-32 Síntese do glicogênio.** A cadeia do glicogênio é alongada pela glicogênio-sintase. A enzima transfere o resíduo de glicose da UDP--glicose para a extremidade não redutora de uma ramificação (ver Figura 7-13) para fazer uma nova ligação ($\alpha1 \rightarrow 4$).

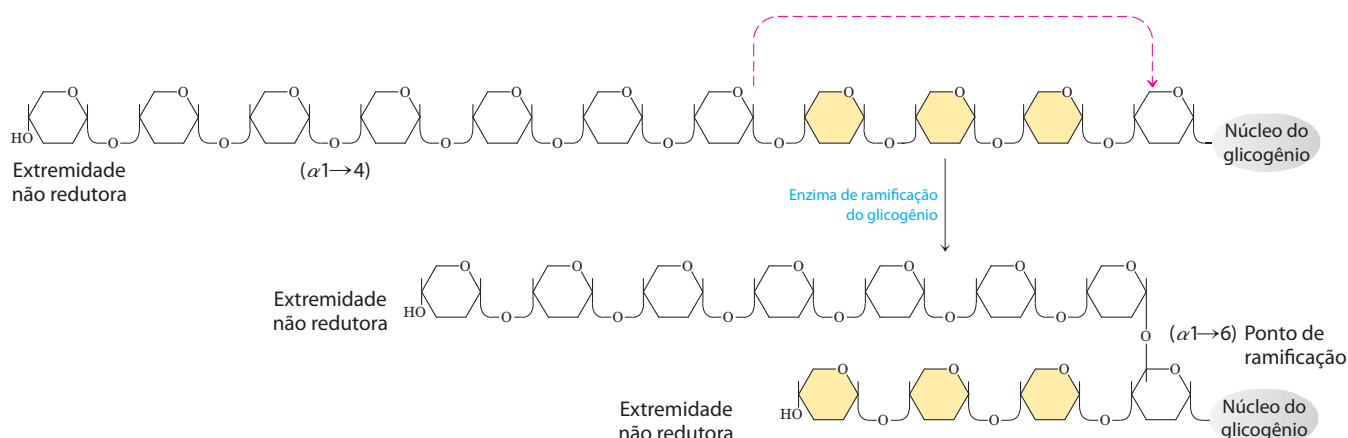



**FIGURA 15-33 Síntese da ramificação do glicogênio.** A enzima de ramificação do glicogênio (também chamada de amilo-[1→4]-[1→6]-transglicosilase, ou glicosil-[4→6]-transferase) forma um novo ponto de ramificação durante a síntese do glicogênio.

A glicogênio-sintase não pode formar as ligações (α1→6) encontradas nos pontos de ramificação do glicogênio, as quais são formadas pela enzima de ramificação, também chamada de **amilo (1→4) a (1→6) transglicosilase**, ou glicosil-(4→6)-transferase. A enzima de ramificação do glicogênio catalisa a transferência de um fragmento terminal de 6 a 7 resíduos de glicose da extremidade não redutora de uma ramificação de glicogênio, contendo pelo menos 11 resíduos, para o grupo hidroxil C-6 de um resíduo de glicose em uma posição mais interna da mesma ou de outra cadeia de glicogênio, criando assim uma nova ramificação (**Figura 15-33**). Resíduos adicionais de glicose podem ser ligados à nova ramificação pela glicogênio-sintase. O efeito biológico da ramificação é tornar a molécula mais solúvel e aumentar o número de sítios acessíveis à glicogênio-fosforilase e à glicogênio-sintase, as quais agem somente nas extremidades não redutoras.

## A glicogenina prepara os resíduos iniciais de glicose no glicogênio

A glicogênio-sintase não consegue iniciar uma cadeia de glicogênio "de novo". Ela necessita de um iniciador, geralmente uma cadeia poliglicosídica em (α1→4) ou uma ramificação que tenha, pelo menos, oito resíduos de glicose. Então, como se inicia uma *nova* molécula de glicogênio? A intrigante proteína **glicogenina** (**Figura 15-34**) é ao mesmo tempo o iniciador, sobre o qual são montadas novas cadeias, e a enzima que catalisa essa montagem. A primeira etapa na síntese de uma nova molécula de glicogênio é a transferência de um resíduo de glicose da UDP-glicose para o grupo hidroxil da $Tyr^{194}$ da glicogenina, catalisada pela atividade glicosil-transferase intrínseca da proteína (**Figura 15-35**). A cadeia nascente se alonga pela adição sequencial de mais sete resíduos de glicose, cada um derivado de uma UDP-glicose; as reações são catalisadas pela atividade de extensão de cadeia da glicogenina. Neste ponto, a glicogênio-sintase age, alongando ainda mais a cadeia de glicogênio. A glicogenina permanece escondida dentro da partícula β, unida covalentemente à única extremidade redutora da molécula de glicogênio (Figura 15-35b). As consequências clínicas de uma mutação no gene da glicogenina que suprime essa atividade de polimerização da proteína incluem fadiga muscular e fraqueza, depleção do glicogênio no fígado e batimento cardíaco irregular (arritmia cardíaca).

## RESUMO 15.4 Metabolismo do glicogênio nos animais

- O glicogênio é armazenado no músculo e no fígado sob a forma de grandes partículas. Dentro das partículas es-

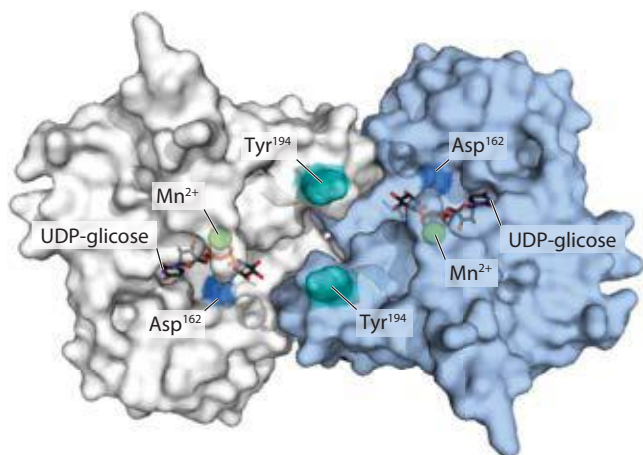



**FIGURA 15-34 Estrutura da glicogenina.** (PDB 1D 1LL2) A glicogenina muscular ($M_r$ 37.000) forma dímeros em solução. Os humanos têm uma segunda isoforma no fígado, glicogenina-2. O substrato, UDP-glicose, está ligado a uma estrutura de Rossmann próximo da extremidade aminoterminal e a alguma distância do resíduo de $Tyr^{194}$ – 15 Å da Tyr no mesmo monômero, 12 Å da Tyr no parceiro dimérico. Cada UDP-glicose está ligada por meio de seus fosfatos a um íon de $Mn^{2+}$ que é essencial para a catálise. Acredita-se que o $Mn^{2+}$ atue como aceptor de pares de elétrons (ácido de Lewis) para estabilizar o grupo de fácil eliminação UDP. A ligação glicosídica no produto tem a mesma configuração no C-1 da glicose que no substrato UDP-glicose, sugerindo que a transferência da glicose do UDP para a $Tyr^{194}$ ocorra em duas etapas. A primeira provavelmente é um ataque nucleofílico pela $Asp^{162}$, formando um intermediário temporário com a configuração invertida. Um segundo ataque nucleofílico pela $Tyr^{194}$ restabelece a configuração inicial.

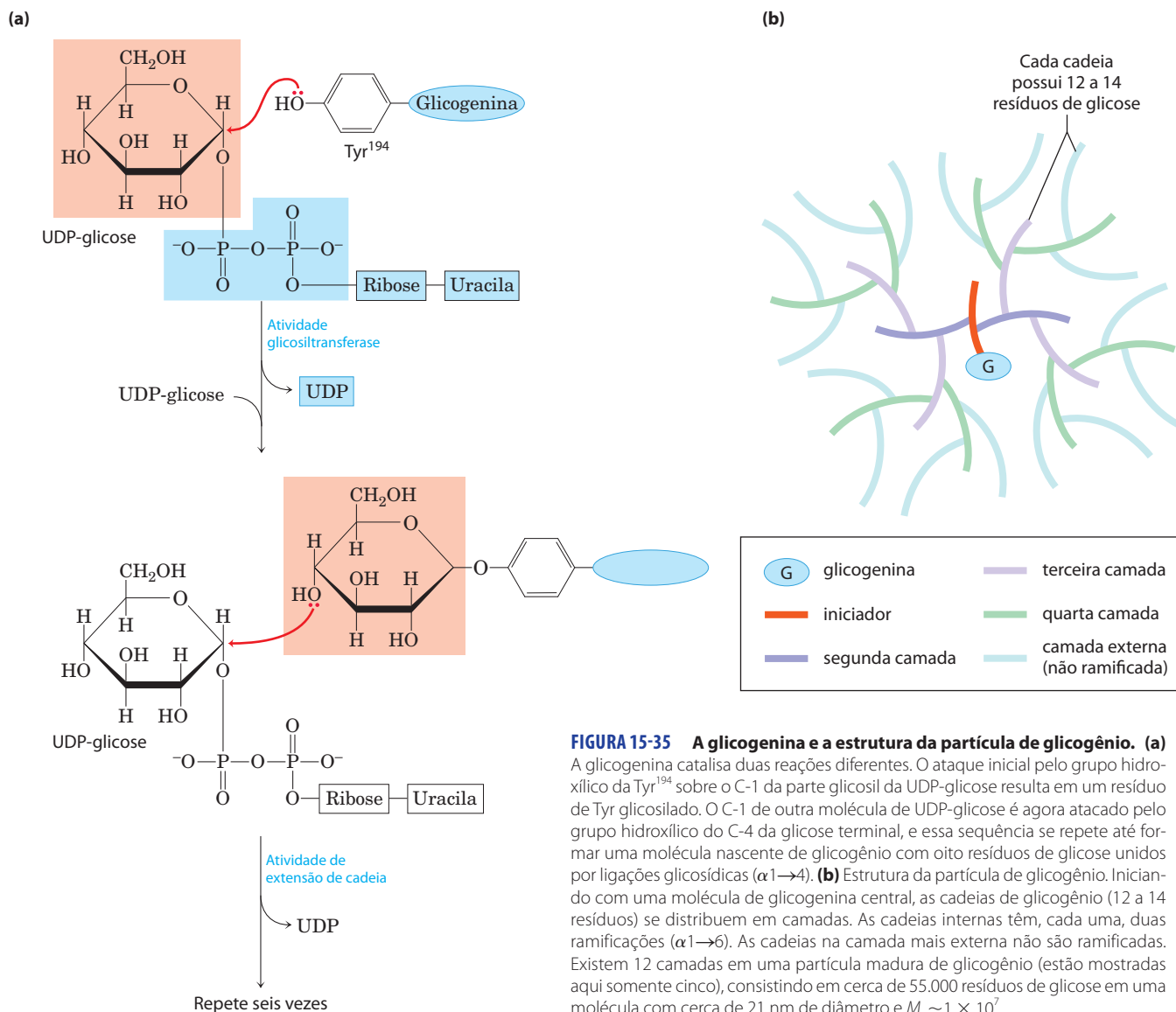



**FIGURA 15-35 A glicogenina e a estrutura da partícula de glicogênio. (a)** A glicogenina catalisa duas reações diferentes. O ataque inicial pelo grupo hidroxílico da Tyr[194] sobre o C-1 da parte glicosil da UDP-glicose resulta em um resíduo de Tyr glicosilado. O C-1 de outra molécula de UDP-glicose é agora atacado pelo grupo hidroxílico do C-4 da glicose terminal, e essa sequência se repete até formar uma molécula nascente de glicogênio com oito resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas ($\alpha$1→4). **(b)** Estrutura da partícula de glicogênio. Iniciando com uma molécula de glicogenina central, as cadeias de glicogênio (12 a 14 resíduos) se distribuem em camadas. As cadeias internas têm, cada uma, duas ramificações ($\alpha$1→6). As cadeias na camada mais externa não são ramificadas. Existem 12 camadas em uma partícula madura de glicogênio (estão mostradas aqui somente cinco), consistindo em cerca de 55.000 resíduos de glicose em uma molécula com cerca de 21 nm de diâmetro e $M_r \sim 1 \times 10^7$.

tão as enzimas que metabolizam o glicogênio, bem como as enzimas reguladoras.

- A glicogênio-fosforilase catalisa a fosforólise nas extremidades não redutoras das cadeias do glicogênio, produzindo glicose-1-fosfato. A enzima de desramificação transfere as ramificações para as cadeias principais e libera o resíduo da ramificação ($\alpha$1→6) como glicose livre.
- A fosfofrutomutase interconverte a glicose-1-fosfato em glicose-6-fosfato, que pode entrar na glicólise ou ser convertida, no fígado, em glicose livre pela glicose-6-fosfatase do retículo endoplasmático, sendo liberada para repor a glicose sanguínea.
- O nucleotídeo de açúcar UDP-glicose doa resíduos de glicose para a extremidade não redutora do glicogênio na reação catalisada pela glicogênio-sintase. Uma enzima de ramificação distinta produz as ligações ($\alpha$1→6) nos pontos de ramificação.
- Novas partículas de glicogênio se iniciam com a formação autocatalítica de uma ligação glicosídica entre a glicose da UDP-glicose e um resíduo de Tyr na proteína glicogenina, seguida pela adição de vários resíduos de glicose para formar um iniciador que pode sofrer os efeitos da glicogênio-sintase.

## 15.5 Regulação coordenada da síntese e da degradação do glicogênio

Conforme foi visto, a mobilização dos estoques de glicogênio é realizada pela glicogênio-fosforilase, que degrada glicogênio a glicose-1-fosfato (Figura 15-27). A glicogênio-fosforilase proporciona um caso especialmente esclarecedor de regulação enzimática. Esse foi um dos primeiros exemplos conhecidos de uma enzima regulada alostericamente e a primeira enzima que se revelou ser controlada

por fosforilação reversível. Ela foi também uma das primeiras enzimas alostéricas cuja estrutura tridimensional detalhada das formas ativa e inativa foi esclarecida por estudos de cristalografia por raios X. A glicogênio-fosforilase é também outro exemplo de como as isoenzimas desempenham seu papel tecido-específico.

## A glicogênio-fosforilase tem regulação alostérica e hormonal

Earl W. Sutherland, Jr., 1915-1974

No final de 1930, Carl e Gerty Cori (Quadro 15-4) descobriram que a glicogênio-fosforilase do músculo esquelético existe em duas formas interconversíveis: **glicogênio--fosforilase *a***, cataliticamente ativa, e **glicogênio-fosforilase *b***, menos ativa (**Figura 15-36**). Estudos subsequentes feitos por Earl Sutherland mostraram que a fosforilase *b* predomina no músculo em repouso, mas que durante uma atividade muscular vigorosa a adrenalina desencadeia a fosforilação de um resíduo específico de Ser na fosforilase *b*, convertendo-a em sua forma mais ativa, fosforilase *a*. (Observe que a glicogênio-fosforilase com frequência é referida simplesmente como fosforilase – muito respeitada por ter sido a primeira fosforilase a ser descoberta; o nome reduzido tem persistido no uso generalizado e na literatura.)

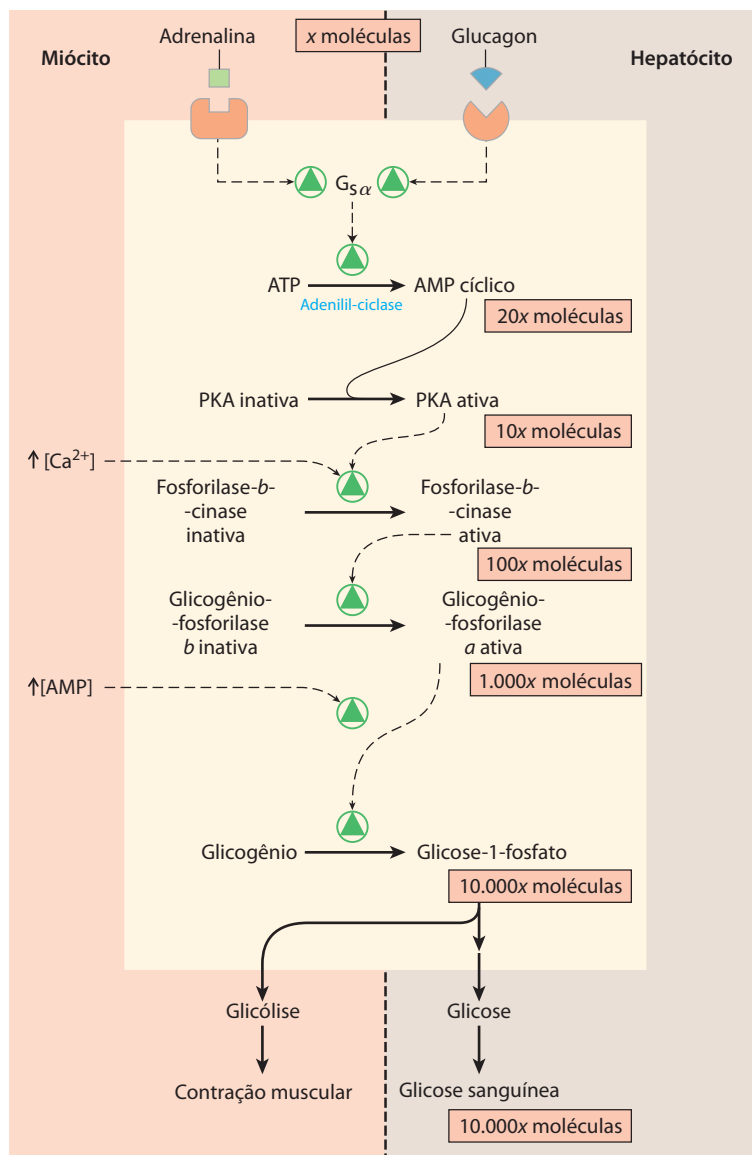
A enzima (fosforilase-*b*-cinase) responsável pela ativação da fosforilase pela transferência de um grupo fosforil para seu resíduo de Ser é, ela própria, ativada por adrenalina ou glucagon por uma série de etapas mostradas na **Figura 15-37**. Sutherland descobriu o segundo mensageiro cAMP, cuja concentração aumenta em resposta ao estímulo pela adrenalina (no músculo) ou pelo glucagon (no fígado). Concentrações elevadas de cAMP iniciam uma **cascata enzimática**, na qual um catalisador ativa um segundo catalisador que ativa mais um catalisador (ver Seção 12.1). Tais cascatas permitem uma grande amplificação do sinal inicial (ver retângulos em cor-de-rosa na Figura 15-37). O aumento da [cAMP] ativa a proteína-cinase dependente de cAMP, também chamada de proteína-cinase A (PKA). Por sua vez, a PKA fosforila e ativa a **fosforilase-*b*-cinase**, que catalisa a fosforilação dos resíduos de Ser nas duas subunidades idênticas da glicogênio-fosforilase, ativando-a e estimulando, assim, a degradação do glicogênio. No músculo, isso fornece combustível para a glicólise sustentar a contração muscular para a resposta de luta ou fuga sinalizada pela adrenalina. No fígado, a degradação do glicogênio age contra a baixa glicose sanguínea sinalizada pelo glucagon, liberando glicose. Essas diferentes funções se refletem em diferenças sutis nos mecanismos reguladores no músculo e no fígado. As glicogênio-fosforilases do fígado e do músculo são isoenzimas, codificadas por genes diferentes, e diferem em suas propriedades reguladoras.

**FIGURA 15-36 Regulação da glicogênio-fosforilase muscular por modificação covalente.** Na forma mais ativa da enzima, fosforilase *a*, os resíduos de Ser[14], um de cada subunidade, estão fosforilados. A fosforilase *a* é convertida em sua forma menos ativa, fosforilase *b*, por perda enzimática destes grupos fosforil, catalisada pela fosforilase-*a*-fosfatase (também conhecida como fosfoproteína-fosfatase 1, PP1). A fosforilase *b* pode ser reconvertida (reativada) em fosforilase *a* pela ação da fosforilase-*b*-cinase. (Ver também a Figura 6-42 sobre a regulação da glicogênio-fosforilase.)

No músculo, há dois mecanismos alostéricos de controle que se sobrepõem à regulação da fosforilase por modificação covalente (Figura 15-37). O $Ca^{2+}$, o sinal para a contração muscular, se liga à fosforilase-*b*-cinase, ativando-a, promovendo a conversão da fosforilase *b* para sua forma ativa *a*. O $Ca^{2+}$ se liga à subunidade δ da fosforilase-*b*-cinase, uma calmodulina (ver Figura 12-11). O AMP, que se acumula no músculo em contração vigorosa como resultado da degradação do ATP, se liga à fosforilase e a ativa, acelerando a liberação da glicose-1-fosfato a partir do glicogênio. Quando os níveis de ATP estão adequados, o ATP bloqueia o sítio alostérico ao qual o AMP se liga, causando a inativação da fosforilase.

Quando o músculo retorna ao repouso, uma segunda enzima, a **fosforilase-*a*-fosfatase**, também chamada de **fosfoproteína-fosfatase 1** (**PP1**), remove os grupos fosforil da fosforilase *a*, convertendo-a em sua forma menos ativa, a fosforilase *b*.

À semelhança da enzima do músculo, a glicogênio--fosforilase do fígado é regulada hormonalmente (por fosforilação/desfosforilação) e alostericamente. A forma desfosforilada é totalmente inativa. Quando o nível de glicose sanguínea está muito baixo, o glucagon (agindo por meio do mecanismo de cascata mostrado na Figura 15-37) ativa a fosforilase-*b*-cinase, que, por sua vez, converte a fosforilase *b* em sua forma ativa *a*, iniciando a liberação da glicose para o sangue. Quando o nível retorna ao normal, a glicose entra nos hepatócitos e se liga a um sítio alostérico inibitório na fosforilase *a*. Essa ligação também produz uma mudança de conformação que expõe os re-

**FIGURA 15-37 Mecanismo de cascata da ação da adrenalina e do glucagon.** Tanto a adrenalina nos miócitos (à esquerda) como o glucagon nos hepatócitos (à direita) ligam-se a receptores específicos de superfície e ativam uma proteína de ligação a GTP, $G_{s\alpha}$ (ver Figura 12-4). Esta proteína quando ativada provoca uma elevação na [cAMP], o que ativa PKA. Isto inicia uma cascata de fosforilações; PKA ativa a fosforilase-*b*-cinase, que ativa a glicogênio-fosforilase. Tais cascatas causam uma grande amplificação do sinal inicial; os números nos retângulos em cor salmão são provavelmente uma subestimativa do aumento real do número de moléculas em cada estágio da cascata. A degradação do glicogênio decorrente fornece glicose, que no miócito pode suprir o ATP (via glicólise) para a contração muscular e no hepatócito é liberada para o sangue para se opor à glicose sanguínea baixa.

síduos fosforilados de Ser à PP1, que catalisa a desfosforilação da fosforilase, causando sua inativação (**Figura 15-38**). O sítio alostérico para a glicose permite à glicogênio-fosforilase hepática atuar como seu próprio sensor de glicose e responder adequadamente às alterações na glicose sanguínea.

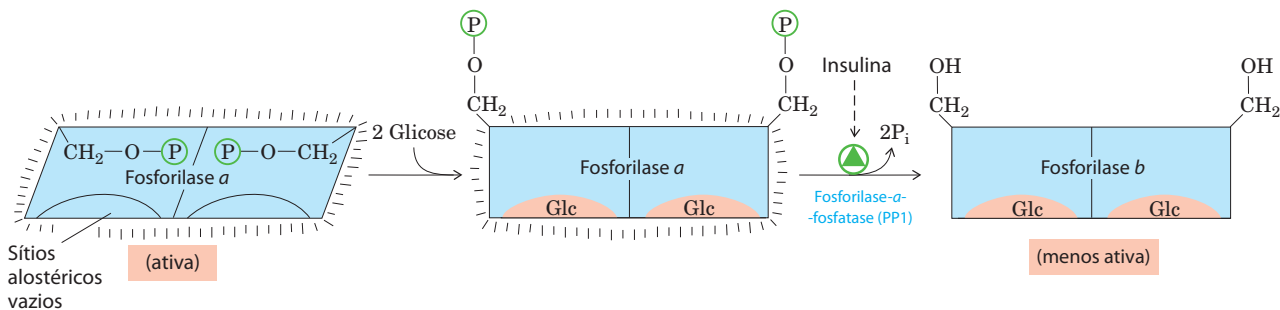
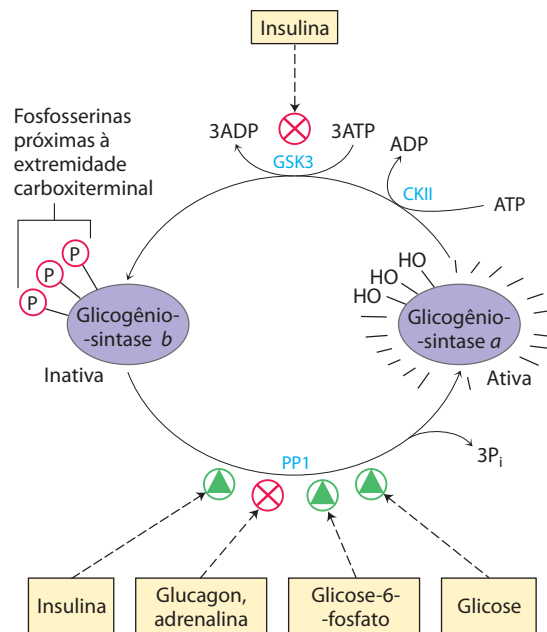



**FIGURA 15-38 A glicogênio-fosforilase do fígado como sensor de glicose.** A ligação da glicose a um sítio alostérico da isoenzima da fosforilase do fígado induz uma mudança conformacional que expõe seus resíduos de Ser fosforilados à ação da fosforilase-fosfatase (PP1). Esta fosfatase converte a fosforilase *a* em fosforilase *b*, reduzindo claramente a atividade de fosforilase e diminuindo a degradação do glicogênio em resposta à alta glicose sanguínea. A insulina também age indiretamente na estimulação da PP1 e na diminuição da degradação do glicogênio.

**FIGURA 15-39 Efeitos da GSK3 sobre a atividade da glicogênio--sintase.** A forma ativa, glicogênio-sintase *a*, tem três resíduos de Ser próximos à sua extremidade carboxílica que são fosforilados pela glicogênio--sintase-cinase 3 (GSK3). Isto a converte na sua forma inativa (*b*). A ação da GSK3 requer uma fosforilação prévia (preparação) pela caseína-cinase (CKII). A insulina desencadeia a ativação da glicogênio-sintase *b* por bloquear a atividade da GSK3 (consultar via na Figura 12-16) e ativar uma fosfoproteína-fosfatase (PP1 no músculo, outra fosfatase no fígado). No músculo, a adrenalina ativa a PKA, que fosforila a proteína de associação ao glicogênio, $G_M$ (ver Figura 15-42), em um sítio que causa a dissociação da PP1 do glicogênio. A glicose-6-fosfato favorece a desfosforilação da glicogênio-sintase por se ligar a ela e promover uma conformação que é um bom substrato para a PP1. A glicose também promove a desfosforilação; a ligação da glicose à glicogênio-fosforilase *a* força uma mudança conformacional que favorece a desfosforilação da glicogênio-fosforilase *b*, aliviando, assim, a inibição da PP1 (ver Figura 15-41).

## A glicogênio-sintase também é regulada por fosforilação e desfosforilação

Tal como a glicogênio-fosforilase, a glicogênio-sintase pode existir nas formas fosforilada e desfosforilada (**Figura 15-39**). Sua forma ativa, **glicogênio-sintase *a***, é não fosforilada. A fosforilação das cadeias laterais hidroxílicas de vários resíduos de Ser de ambas as subunidades converte a glicogênio-sintase *a* em **glicogênio-sintase *b***, que é inativa na ausência da glicose, seu ativador alostérico. A glicogênio-sintase é impressionante por sua capacidade de ser fosforilada em vários resíduos por, pelo menos, 11 diferentes proteínas-cinases. A cinase reguladora mais importante é a **glicogênio-sintase-cinase 3** (**GSK3**), que adiciona grupos fosforil a três resíduos de Ser próximos à extremidade carboxílica da glicogênio-sintase, inativando-a fortemente. A ação da GSK3 é hierárquica; ela só pode fosforilar a glicogênio-sintase depois que outra proteína-cinase, **caseína--cinase II** (**CKII**), tenha fosforilado a glicogênio-sintase em um resíduo próximo, evento chamado de **preparação** (**Figura 15-40a**).

No fígado, a conversão da glicogênio-sintase *b* em sua forma ativa é promovida pela PP1, que se encontra ligada à partícula de glicogênio. A PP1 remove os grupos fosforil dos três resíduos fosforilados pela GSK3. A glicose-6--fosfato se liga a um sítio alostérico na glicogênio-sintase *b*, tornando a enzima um substrato melhor para a desfosforilação pela PP1 e causando sua inativação. Por analogia com a glicogênio-fosforilase, que age como sensor de glicose, a

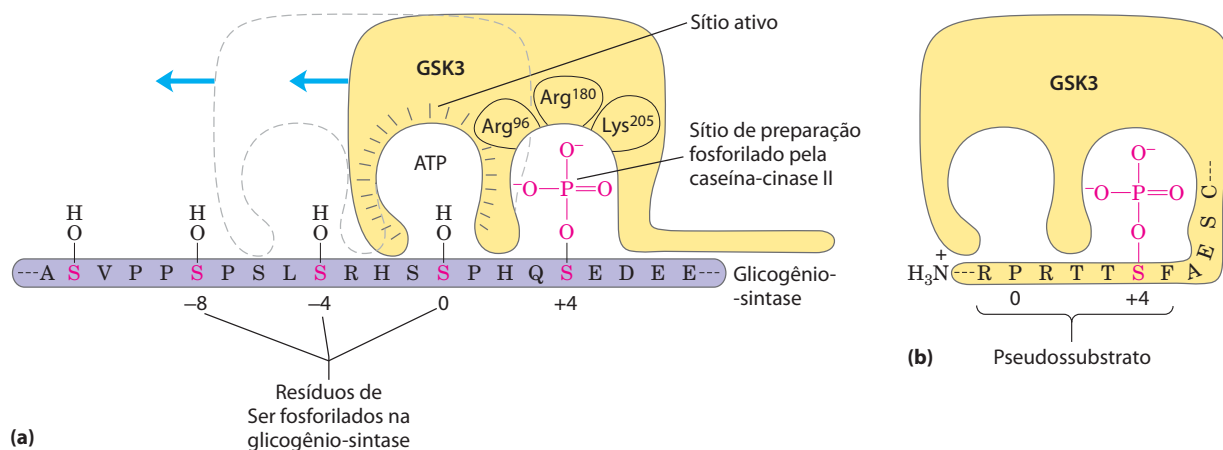



**FIGURA 15-40 Preparação para a fosforilação da glicogênio-sintase pela GSK3. (a)** A glicogênio-sintase-cinase 3 se associa primeiramente com seu substrato (glicogênio-sintase) por interação entre os três resíduos carregados positivamente ($Arg^{96}$, $Arg^{180}$, $Lys^{205}$) e um resíduo de fosfosserina na posição +4 no substrato. (Para orientação, o resíduo de Ser ou Thr a ser fosforilado no substrato está marcado com índice 0. Os resíduos no lado aminoterminal deste resíduo estão numerados como −1, −2, e assim por diante; os resíduos no lado carboxiterminal estão numerados como +1, +2, e assim por diante.) Essa associação alinha o sítio ativo da enzima com o resíduo de Ser na posição 0, que ela fosforila. Isto cria um novo sítio de preparação, e a enzima se desloca ao longo da proteína para fosforilar a Ser na posição −4, e a seguir a Ser na posição −8. **(b)** A GSK3 tem um resíduo de Ser próximo de sua extremidade aminoterminal que pode ser fosforilado pela PKA ou pela PKB (ver Figura 15-41). Isto produz uma região de "pseudossubstrato" na GSK3 que se dobra para o sítio de preparação e torna o sítio ativo inacessível a outro substrato proteico, inibindo a GSK3 até que a PP1 remova o grupo fosforil do pseudossubstrato. Outras proteínas que são substrato para a GSK3 também têm um sítio de preparação na posição +4, que deve ser fosforilado por outra proteína-cinase antes que a GSK possa agir sobre elas. (Consulte também as Figuras 6-37 e 12-22b sobre a regulação da glicogênio-sintase.)

glicogênio-sintase pode ser considerada um sensor de glicose-6-fosfato. No músculo, uma fosfatase diferente pode ter o mesmo papel desempenhado pela PP1 no fígado, ativando a glicogênio-sintase por desfosforilação.

## A glicogênio-sintase-cinase 3 controla algumas ações da insulina

Conforme visto no Capítulo 12, a insulina desencadeia mudanças intracelulares pela ativação de uma proteína-cinase (PKB) que, por sua vez, fosforila e inativa a GSK3 (**Figura 15-41**; ver também Figura 12-16). A fosforilação de um resíduo de Ser próximo da extremidade aminoterminal da GSK3 converte esta região da proteína em um pseudossubstrato, que se dobra para dentro do sítio ao qual normalmente se liga o resíduo de Ser fosforilado (Figura 15-40b). Isso impede a GSK3 de se ligar ao sítio de preparação do substrato verdadeiro, inativando, assim, a enzima e fazendo pender o equilíbrio em favor da desfosforilação da glicogênio-sintase pela PP1. A glicogênio-fosforilase também pode afetar a fosforilação da glicogênio-sintase: a glicogênio-fosforilase ativada inibe PP1 diretamente, impedindo-a de ativar a glicogênio-sintase (Figura 15-39).

Embora tenha sido descoberta pelo seu papel no metabolismo do glicogênio (daí o nome glicogênio-sintase-cinase), a GSK3 tem um papel muito mais abrangente que o de regulação da glicogênio-sintase. Ela é responsável por mediar a sinalização pela insulina e outros fatores de crescimento e nutrientes, atuando na especificação dos destinos celulares durante o desenvolvimento embrionário. Entre os seus alvos estão proteínas do citoesqueleto e proteínas essenciais para a síntese de mRNA e de proteínas. Esses alvos, assim como a glicogênio-sintase, precisam sofrer uma fosforilação preparatória por outra proteína-cinase para que possam ser fosforilados pela GSK3.

## A fosfoproteíno-fosfatase 1 é central no metabolismo do glicogênio

Uma única enzima, PP1, pode remover grupos fosforil das três enzimas que são fosforiladas em resposta ao glucagon (no fígado) e à adrenalina (no fígado e no músculo): fosforilase-cinase, glicogênio-fosforilase e glicogênio-sintase. A insulina estimula a síntese do glicogênio por ativar a PP1 e inativar a GSK3.

A fosfoproteíno-fosfatase 1 não existe livre no citosol. Ela está firmemente ligada às suas proteínas-alvo por uma proteína da família das **proteínas de associação ao glicogênio** que se liga ao glicogênio e às três enzimas glicogênio-fosforilase, fosforilase-cinase e glicogênio-sintase (**Figura 15-42**). A própria PP1 está sujeita à regulação covalente e alostérica: ela é inativada quando fosforilada pela PKA e é ativada alostericamente pela glicose-6-fosfato.

## Sinais alostéricos e hormonais coordenam integralmente o metabolismo dos carboidratos

Após abordar os mecanismos que regulam as enzimas individuais, agora é possível considerar as variações totais no metabolismo dos carboidratos que ocorrem no estado bem alimentado, durante o jejum e na resposta de luta ou fuga – sinalizados, respectivamente, por insulina, glucagon e adrenalina. É preciso destacar dois casos nos quais a regulação tem finalidades diferentes: (1) o papel dos hepatócitos no suprimento de glicose para o sangue, e (2) o uso egoísta dos carboidratos como combustível pelos tecidos extra-hepáticos, simbolizados pelo músculo esquelético (miócitos), para manter suas próprias atividades.

Após a ingestão de uma refeição rica em carboidratos, a elevação da glicose sanguínea provoca a liberação

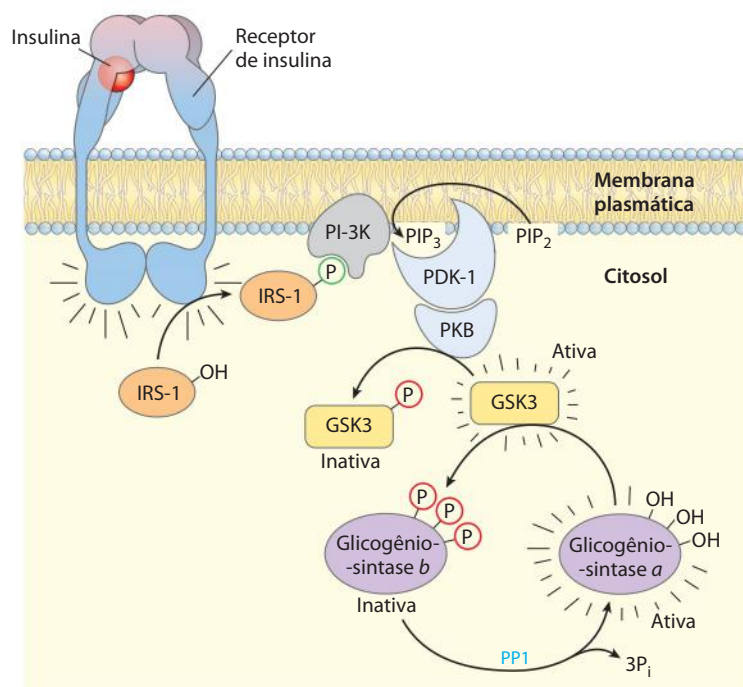



**FIGURA 15-41 O caminho a partir da insulina até a GSK3 e a glicogênio-sintase.** A ligação da insulina ao seu receptor ativa nele uma tirosina-proteína-cinase, que fosforila o substrato-1 do receptor da insulina (IRS-1). A fosfotirosina nessa proteína é então ligada pela fosfatidilinositol-3-cinase (PI-3K), que converte, na membrana, o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP$_2$) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP$_3$). Uma proteína-cinase (PDK-1), que é ativada quando ligada ao PIP$_3$, ativa uma segunda proteína-cinase (PKB), que fosforila a glicogênio-sintase-cinase 3 (GSK3) na sua região de pseudossubstrato, inativando-a pelos mecanismos mostrados na Figura 15-40b. A inativação da GSK3 permite que a fosfoproteína-fosfatase 1 (PP1) desfosforile e ative a glicogênio-sintase. Dessa forma, a insulina estimula a síntese do glicogênio. (Consulte na Figura 12-16 mais detalhes sobre a ação da insulina.)

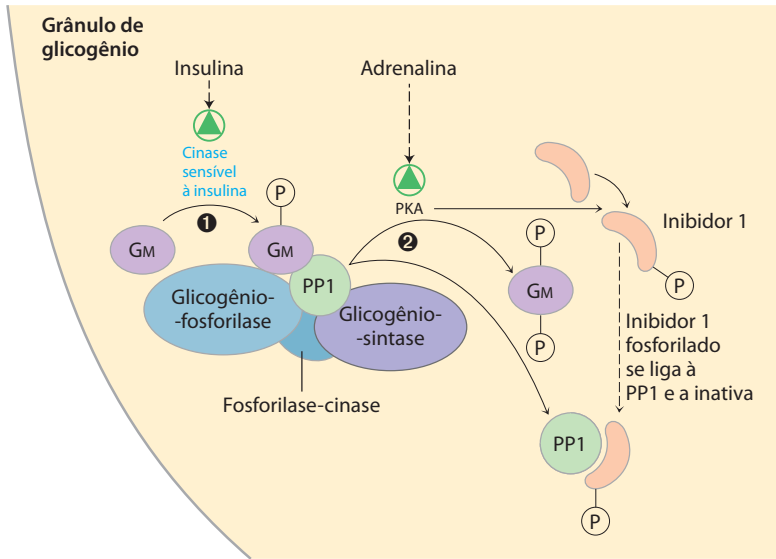



**FIGURA 15-42 Proteína de associação ao glicogênio GM.** A proteína GM de associação ao glicogênio pertence à família de proteínas que ligam outras proteínas (incluindo PP1) às partículas de glicogênio. A GM pode ser fosforilada em dois sítios diferentes em resposta à insulina ou adrenalina. ❶ A fosforilação no sítio 1, estimulada pela insulina, ativa a PP1 que desfosforila a fosforilase-cinase, a glicogênio-fosforilase e a glicogênio-sintase. ❷ A fosforilação no sítio 2, estimulada pela adrenalina, causa a dissociação de PP1 da partícula de glicogênio, impedindo seu acesso à glicogênio-fosforilase e à glicogênio-sintase. A PKA também fosforila uma proteína (inibidor 1) que, quando fosforilada, inibe a PP1. Desta forma, a insulina inibe a degradação do glicogênio e estimula a sua síntese, e a adrenalina (ou o glucagon, no fígado) tem o efeito oposto.

de insulina (**Figura 15-43**, parte superior). Nos hepatócitos, a insulina tem dois efeitos imediatos: ela inativa a GSK3, agindo por meio da cascata mostrada na Figura 15-41, e ativa uma proteína-fosfatase, talvez a PP1. Essas duas ações ativam totalmente a glicogênio-sintase. A PP1 também inativa a glicogênio-fosforilase *a* e a fosforilase-cinase pela desfosforilação de ambas, interrompendo de forma efetiva a degradação do glicogênio. A glicose entra no hepatócito por meio do transportador de alta capacidade GLUT2, sempre presente na membrana plasmática, e a glicose intracelular elevada leva à dissociação da hexocinase IV (glicocinase) de sua proteína reguladora nuclear (Figura 15-15). A hexocinase IV entra no citosol e fosforila a glicose, estimulando a glicólise, além de fornecer o precursor para a síntese de glicogênio. Sob essas condições, os hepatócitos usam o excesso de glicose do sangue para sintetizar glicogênio, até o limite de 10% do peso total do fígado.

Entre as refeições, ou durante um jejum prolongado, a queda da glicose sanguínea provoca a liberação de glucagon, o qual, agindo por meio da cascata mostrada na Figura 15-37, ativa a PKA. Essa enzima controla todos os efeitos do glucagon (Figura 15-43, parte inferior). Ela fosforila a fosforilase-cinase, ativando-a e levando à ativação da glicogênio-fosforilase. Ela fosforila a glicogênio-sintase, inativando-a e bloqueando a síntese de glicogênio. Ela fosforila a PFK-2/FBPase-2, levando a uma redução na concentração do regulador frutose-2,6-bifosfato, que tem o efeito de inativar a enzima glicolítica PFK-1 e de ativar a enzima gliconeogênica FBPase-1. E ela fosforila e inativa a enzima glicolítica piruvato-cinase. Sob essas condições, o fígado produz glicose-6-fosfato pela degradação do glicogênio e pela gliconeogênese, e para de usar a gli-

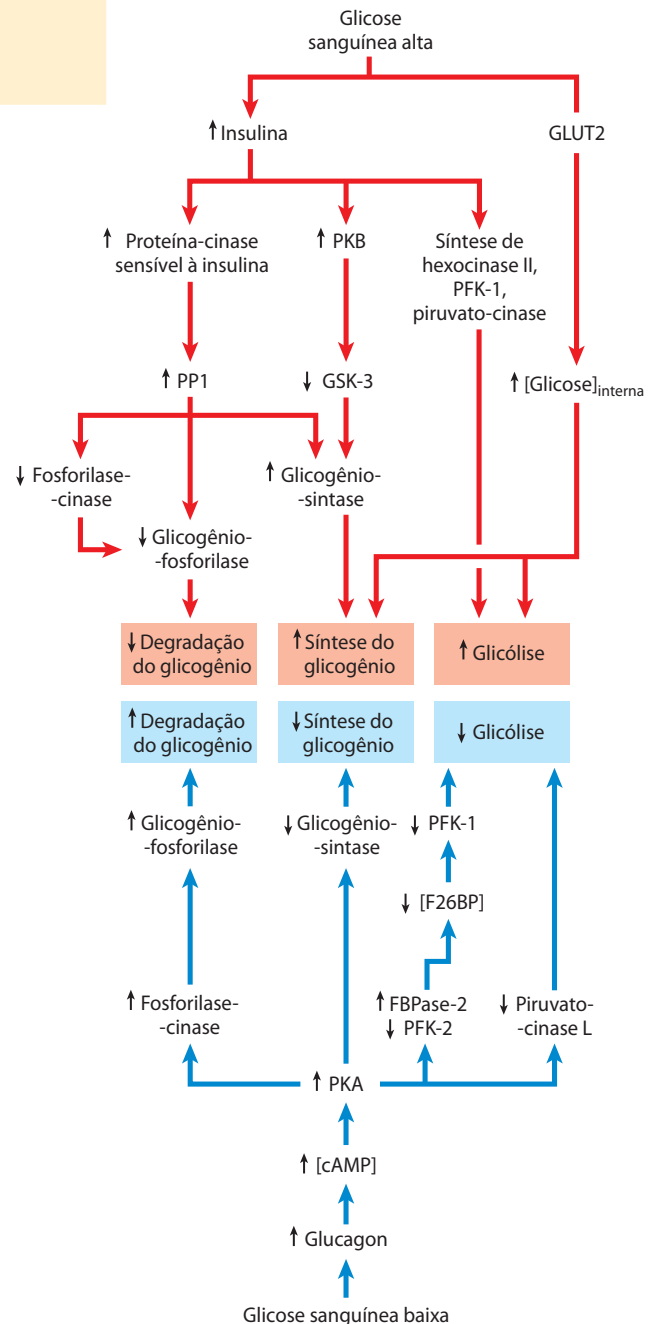



**FIGURA 15-43 Regulação do metabolismo de carboidratos no fígado.** As setas indicam as relações causais entre as mudanças que elas conectam. Por exemplo, uma seta de ↓A para ↑B significa que uma redução de A causa um aumento de B. As setas vermelhas conectam eventos resultantes da glicose sanguínea alta; as setas azuis conectam eventos resultantes da glicose sanguínea baixa.

cose na glicólise ou na síntese de glicogênio, maximizando a quantidade de glicose que pode liberar para o sangue. Essa liberação de glicose é possível somente no fígado e no rim, porque outros tecidos não têm glicose-6-fosfatase (Figura 15-30).

A fisiologia do músculo esquelético difere da do fígado em três aspectos importantes para a nossa discussão sobre regulação metabólica (**Figura 15-44**): (1) o músculo usa seu glicogênio armazenado somente para suas próprias necessidades; (2) quando passa do repouso para a contração vigorosa, o músculo sofre mudanças muito grandes em sua demanda por ATP, a qual é suprida pela glicólise; (3) o músculo não tem a maquinaria enzimática para a gliconeogênese. A regulação do metabolismo de carboidratos no músculo reflete essas diferenças em relação ao fígado. Em primeiro lugar, os miócitos não têm receptores para o glucagon. Em segundo lugar, a isoenzima muscular da piruvato-cinase não é fosforilada pela PKA, e assim a glicólise não é interrompida quando a [cAMP] estiver alta. Na verdade, o cAMP *aumenta* a velocidade da glicólise no músculo, provavelmente por ativar a glicogênio-fosforilase. Quando a adrenalina é liberada no sangue em situações de luta ou fuga, a PKA é ativada pela elevação da [cAMP] e fosforila e ativa a glicogênio-fosforilase-cinase. As consequentes fosforilação e ativação da glicogênio-fosforilase resultam em degradação mais rápida do glicogênio. A adrenalina não é liberada em condições de baixo estresse, mas, com cada estímulo neuronal da contração muscular, a [$Ca^{2+}$] aumenta brevemente e ativa a fosforilase-cinase por meio de sua subunidade de calmodulina.

A elevação da insulina provoca aumento na síntese do glicogênio nos miócitos pela ativação da PP1 e inativação da GSK3. Ao contrário dos hepatócitos, os miócitos têm uma reserva de transportadores GLUT4 sequestrada em vesículas intracelulares. A insulina provoca seu deslocamento para a membrana plasmática (ver Figura 12-16), onde eles permitem o aumento na captação de glicose. Consequentemente, os miócitos ajudam a baixar a glicose sanguínea em resposta à insulina, porque aumentam a taxa de captação de glicose, a síntese de glicogênio e a glicólise.

**FIGURA 15-44 Diferenças na regulação do metabolismo de carboidratos no fígado e no músculo.** No fígado, glucagon (indicando baixa glicose sanguínea) ou adrenalina (sinalizando a necessidade de lutar ou correr) têm o efeito de maximizar a saída da glicose para a corrente sanguínea. No músculo, a adrenalina aumenta a degradação do glicogênio e a glicólise que, juntas, fornecem combustível para a produção do ATP necessário na contração muscular.

## O metabolismo de carboidratos e de lipídeos é integrado por mecanismos hormonais e alostéricos

Apesar de complexa, a regulação do metabolismo de carboidratos está longe da história completa do metabolismo energético. O metabolismo das gorduras e dos ácidos graxos está intimamente ligado ao dos carboidratos. Sinais hormonais como insulina e alterações na dieta ou exercício são igualmente importantes na regulação do metabolismo das gorduras e na integração com o dos carboidratos. O Capítulo 23 volta a abordar essa integração metabólica global, não antes de serem estudadas as vias metabólicas das gorduras e dos aminoácidos (Capítulos 17 e 18). A mensagem que se deseja transmitir aqui é que as vias metabólicas estão sujeitas a controles reguladores complexos extremamente sensíveis a alterações nas condições metabólicas. Esses mecanismos agem no ajuste do fluxo de metabólitos por várias vias metabólicas, conforme a necessidade da célula e do organismo, e o fazem sem causar alterações importantes nas concentrações dos intermediários compartilhados por outras vias.

### RESUMO 15.5 Regulação coordenada da síntese e da degradação do glicogênio

- A glicogênio-fosforilase é ativada em resposta ao glucagon ou à adrenalina, que aumentam a [cAMP] e ativam PKA. A PKA fosforila e ativa a fosforilase-cinase, que converte a glicogênio-fosforilase *b* em sua forma ativa *a*. A fosfoproteíno-fosfatase 1 (PP1) reverte a fosforilação da glicogênio-fosforilase *a*, inativando-a. A glicose se liga à isoenzima hepática da glicogênio-fosforilase *a*, o que favorece sua desfosforilação e inativação.
- A glicogênio-sintase *a* é inativada por fosforilação catalisada pela GSK3. A insulina bloqueia a GSK3. A PP1, que é ativada pela insulina, reverte a inibição pela desfosforilação da glicogênio-sintase *b*.
- A insulina aumenta a captação da glicose pelos miócitos e adipócitos por provocar o deslocamento do transportador GLUT4 para a membrana plasmática.
- A insulina estimula a síntese das hexocinases II e IV, PFK-1, piruvato-cinase, e várias enzimas envolvidas na síntese de lipídeos. A insulina estimula a síntese de glicogênio no músculo e no fígado.
- No fígado, o glucagon estimula a degradação do glicogênio e a gliconeogênese, enquanto bloqueia a glicólise, poupando, dessa forma, glicose para exportá-la para o cérebro e outros tecidos.
- No músculo, a insulina estimula a degradação do glicogênio e a glicólise, fornecendo ATP para sustentar a contração.

## Termos-chave

*Os termos em negrito estão definidos no glossário.*



## Leituras adicionais

### Regulação das vias metabólicas


**Desvergne, B., Michalik, L., & Wahli, W.** (2006) Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* **86**, 465–514.


Revisão avançada e abrangente.


**Gibson, D. & Harris, R.A.** (2001) *Metabolic Regulation in Mammals*, Taylor & Francis, New York.


Excelente e agradável relato sobre a regulação metabólica.


**Li, X. & Snyder, M.** (2011) Metabolites as global regulators: a new view of protein regulation. *Bioessays* 33, 485–489.

**Naïmi, M., Arous, C., & Obberghen, E.** (2010) Energetic cell sensors: a key to metabolic homeostasis. *Trends Endocrinol. Med.* **21**, 75–82.

**Storey, K.B. (ed.).** (2004) *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, Wiley-Liss, Inc., Hoboken, NJ.


Excelente discussão dos princípios da regulação metabólica, transdução de sinal, controle de transcrição e metabolismo energético na saúde e na doença.

### Análise do controle metabólico


**Castrillo, J.I. & Oliver, S.G.** (2007) Metabolic control in the eukaryotic cell, a systems biology perspective. *Meth. Microbiol.* 36, 527–549. doi:10.1016/S0580-9517(06)36021-7

**Fell, D.A.** (1992) Metabolic control analysis: a survey of its theoretical and experimental development. *Biochem. J.* **286**, 313–330.


Relatório claro dos princípios da análise do controle metabólico.


**Fell, D.A.** (1997) *Understanding the Control of Metabolism*, Portland Press, Ltd., London.


Exposição excelente e clara da regulação metabólica, do ponto de vista da análise do controle metabólico. Se você for ler apenas uma publicação sobre análise do controle metabólico, esta deve ser a escolhida.


**Heinrich, R. & Rapoport, T.A.** (1974) A linear steady-state treatment of enzymatic chains: general properties, control and effector strength. *Eur. J. Biochem.* **42**, 89–95.


Declarações iniciais dos princípios da análise do controle metabólico. Consulte também o artigo de Kacser & Burns, citado abaixo.


**Jeffrey, F.M.H., Rajagopal, A., Maloy, C.R., & Sherry, A.D.** (1991) $^{13}$C-NMR: a simple yet comprehensive method for analysis of intermediary metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 5–10.


Revisão concisa de nível intermediário.


**Kacser, H. & Burns, J.A.** (1973) The control of flux. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **32**, 65–104.


Artigo clássico na área. Ver também o artigo de Heinrich & Rapoport, citado acima.


**Kacser, H., Burns, J.A., & Fell, D.A.** (1995) The control of flux: 21 years on. *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 341–366.

**Saavedra, E., Rodriguez-Enriquesz, S., Quezada, H., Jasso-Chavez, R., & Moreno-Sanchez, R.** (2011) Rational design of strategies based on metabolic control analysis. In *Comprehensive Biotechnology*, 2nd edn, Vol. 1 (Moo-Young, M., Butler, M., Webb. C., Moreira, A., Grodzinski, B., Cui, Z.E., and Agathos, S., eds), pp. 511–524. Pergamon Press, Elmsford, NY.

**Schilling, C.H., Schuster, S., Palsson, B.O., & Heinrich, R.** (1999) Metabolic pathway analysis: basic concepts and scientific applications in the post-genomic era. *Biotechnol. Prog.* **15**, 296–303.


Discussão breve e avançada sobre os tratamentos teóricos que tentam encontrar maneiras de manipular o metabolismo para aperfeiçoar a formação de produtos metabólicos.


**Schuster, S., Fell, D.A., & Dandekar, T.** (2000) A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks. *Nat. Biotechnol.* **18**, 326–332.


Análise interessante e provocativa da interação entre a via das pentoses-fosfato e a glicólise, sob o ponto de vista teórico.


**Sohn, S.B., Kim, T.Y., Kim, J.M., Park, J.M., & Lee, S.Y.** (2011) Metabolic control. In *Comprehensive Biotechnology*, 2nd edn, Vol. 2 (Moo-Young, M., Butler, M., Webb, C., Moreira, A., Grodzinski, B., Cui, Z.F., and Agathos, S., eds), pp. 853–861. Pergamon Press, Elmsford, NY.

**Varma, A. & Palsson, B.O.** (1994) Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. *Bio/Technology* 12, 994–98.

**Westerhoff, H.V., Hofmeyr, J.-H.S., & Kholodenko, B.N.** (1994) Getting to the inside of cells using metabolic control analysis. *Biophys. Chem.* **50**, 273–283.

## Regulação coordenada da glicólise e da gliconeogênese

**Armoni, M., Harel, C., & Karnieli, E.** (2007) Transcriptional regulation of the GLUT4 gene: from PPAR-gamMa and FOXO1 to FFA and inflamMation. *Trends Endocrinol. Metab.* **18**, 100–107.

**Barthel, A., Schmoll, D., & Unterman, T.G.** (2005) FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol. Metab*. **16**, 183–189.

Revisão de nível intermediário dos efeitos dos fatores de transcrição sobre o metabolismo dos carboidratos.

**Brady, M.J., Pessin, J.E., & Saltiel, A.R.** (1999) Spatial compartmentalization in the regulation of glucose metabolism by insulin. *Trends Endocrinol. Metab*. **10**, 408–413.

Revisão de nível intermediário.

**Carling, D.** (2004) The AMP-activated protein kinase cascade – a unifying system for energy control. *Trends Biochem. Sci*. **29**, 18–24.

Revisão de nível intermediário da AMPK e seu papel no metabolismo energético.

**de la Iglesia, N., Mukhtar, M., Seoane, J., Guinovart, J.J., & Agius, L.** (2000) The role of the regulatory protein of glucokinase in the glucose sensory mechanism of the hepatocyte. *J. Biol. Chem.* **275**, 10,597–10,603.

Relato da determinação experimental dos coeficientes de controle de fluxo para a glicocinase e a proteína reguladora da glicocinase nos hepatócitos.

**Dean, L. & McEntyre, J.** (2004) *The Genetic Landscape of Diabetes*, National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=diabetes.

Um livro excelente, de leitura muito agradável, e disponível na Internet (gratuito). Inclui uma introdução ao diabetes, a história dos estudos sobre diabetes e capítulos sobre os fatores genéticos em IDDM, NIDDM e MODY.

**Desverne, B., Michalik, L., & Wahli, W.** (2006) Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol. Rev*. **86**, 465–514.

Revisão avançada e extensa dos fatores de transcrição, incluindo aqueles que regulam o metabolismo dos carboidratos e das gorduras.

**Grüning, N.-M., Lehrach, H., & Ralser, M.** (2010) Regulatory crosstalk of the metabolic network. *Trends Biochem. Sci*. **35**, 220–227.

**Hardie, D.G.** (2007) AMP-activated protein kinase as a drug target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. **47**, 185–210.

Revisão avançada, com ênfase sobre o possível papel desta enzima no diabetes tipo II.

**Herman, M.A. & Kahn, B.B.** (2006) Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *J. Clin. Invest*. **116**, 1767–1775.

Revisão de nível intermediário, lindamente ilustrada.

**Hers, H.G. & Van Schaftingen, E.** (1982) Fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its discovery. *Biochem. J.* **206**, 1–12.

Descrição clássica desta molécula reguladora e de seu papel na regulação do metabolismo dos carboidratos.

**Hue, L. & Rider, M.H.** (1987) Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochem. J.* **245**, 313–324.

**Jorgensen, S.B., Richter, E.A., & Wojtaszewski, J.F.P.** (2006) Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. *J. Physiol.* **574**, 17–31.

**Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., & Hardie, D.G.** (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*. **1**, 15–25.

Revisão de nível intermediário, muito bem ilustrada.

**Long, Y.C. & Zierath, J.R.** (2006) AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J. Clin. Invest*. **116**, 1776–1783.

Revisão curta e avançada, sobre o papel da AMPK no metabolismo, incluindo dados sobre camundongos nocaute.

**Nordlie, R.C., Foster, J.D., & Lange, A.J.** (1999) Regulation of glucose production by the liver. *Annu. Rev. Nutr*. **19**, 379–406.

Revisão avançada.

**Okar, D.A., Manzano, A., Navarro-Sabate, A., Riera, L., Bartrons, R., & Lange, A.J.** (2001) PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends Biochem. Sci*. **26**, 30–35.

**Pilkis, S.J. & Granner, D.K.** (1992) Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Physiol*. **54**, 885–909.

**Postic, C., Dentin, R., Denechaud, P.-D., & Girard, J.** (2007) ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr*. **27**, 179–192.

Revisão avançada sobre o papel do fator de transcrição ChREBP no metabolismo dos carboidratos.

**Rider, M.H. & Bartrons, R.** (2010) Fructose 2,6-bisphosphate: the last milestone of the 20th century in metabolic control? *Biochem. J.* doi:10.1042/BJ20091921.

**Schirmer, T. & Evans, P.R.** (1990) Structural basis of the allosteric behavior of phosphofructokinase. *Nature* **343**, 140–145.

**Towle, H.C.** (2005) Glucose as a regulator of eukaryotic gene transcription. *Trends Endocrinol. Metab.* **16**, 489–494.

Revisão de nível intermediário.

**Towler, M.C. & Hardie, D.G.** (2007) AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ. Res.* **100**, 328–341.

**van Shaftingen, E. & Gerin, I.** (2002) The glucose-6-phosphatase system. *Biochem. J*. **362**, 513–532.

**Veech, R.L.** (2003) A humble hexose monophosphate pathway metabolite regulates short- and long-term control of lipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 5578–5580.

Revisão breve do trabalho do laboratório de K. Uyeda sobre o papel da xilulose-5-fosfato no metabolismo dos carboidratos e das gorduras. Os artigos de Uyeda estão citados nesta revisão.

**Yamada, K. & Noguchi, T.** (1999) Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochem. J.* **337**, 1–11.

## Metabolismo do glicogênio nos animais

**Moslemi, A.-R., Lindberg, C., Nilsson, J., Tajsharghi, H., Andersson, B., & Oldfors, A.** (2010) Glycogenin-1 deficiency and inactivated priming of glycogen synthesis. *N. Engl. J. Med*. **362**, 1203–1210.

**Whelan, W.J.** (1976) On the origin of primer for glycogen synthesis. *Trends Biochem. Sci.* **1**, 13–15.

Revisão de nível intermediário da descoberta, das propriedades e do papel da glicogenina.

## Regulação coordenada da síntese e da degradação do glicogênio

**Aiston, S., Hampson, L., Gomez-Foix, A.M., Guinovart, J.J., & Agius, L.** (2001) Hepatic glycogen synthesis is highly sensitive to phosphorylase activity: evidence from metabolic control analysis. *J. Biol. Chem.* **276**, 23,858–23,866.

**Jope, R.S. & Johnson, G.V.W.** (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 95–102.

Revisão de nível intermediário, muito bem ilustrada.

## Problemas

**1. Medida das concentrações intracelulares dos metabólitos.** A medida das concentrações intracelulares dos metabólitos em uma célula viva apresenta grandes dificuldades experimentais – geralmente a célula deve ser destruída para que possam ser medidas as concentrações dos metabólitos. Além disso, as enzimas catalisam interconversões metabólicas muito rapidamente, de forma que um problema comum associado com essas medidas é que os dados não refletem as concentrações fisiológicas dos metabólitos, mas sim as concentrações no equilíbrio. Uma técnica experimental confiável requer que todas as reações catalisadas pelas enzimas sejam interrompidas instantaneamente no tecido intacto para que os intermediários metabólicos não sofram alteração. Esse objetivo é alcançado pela compressão rápida do tecido entre grandes placas de alumínio resfriadas com nitrogênio líquido (−190°C), processo chamado de **compressão e congelamento.** Após o congelamento, que interrompe instantaneamente a ação enzimática, o tecido é pulverizado, e as enzimas são inativadas por precipitação com ácido perclórico. O precipitado é removido por centrifugação, e os metabólitos são analisados no extrato sobrenadante límpido. Para calcular as concentrações intracelulares, o volume intracelular é determinado a partir do conteúdo total de água do tecido e de uma medida do volume extracelular.

As concentrações intracelulares dos substratos e dos produtos da reação da fosfofrutocinase-1 em tecido cardíaco isolado de rato estão na tabela abaixo.

| Metabólito | Concentração ($\mu$M)* |
|---|---|
| Frutose-6-fosfato | 87,0 |
| Frutose-1,6-bifosfato | 22,0 |
| ATP | 11.400 |
| ADP | 1.320 |

**Fonte:** Williamson, J.R. (1965) Glycolytic control mechanisms I: Inhibition of glycolysis by acetate and pyruvate in the isolated, perfused rat heart. *J. Biol. Chem* **240,** 2308-2321.
* Calculada como $\mu$mol/mL de água intracelular.

(a) Calcule $Q$, [frutose-1,6-bifosfato][ADP]/[frutose-6-fosfato][ATP], da reação da PFK-1 sob condições fisiológicas.

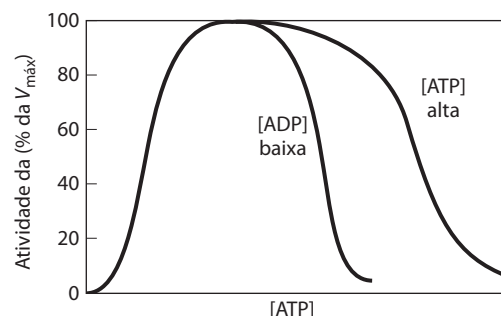
(b) Dado o $\Delta G'^\circ$ de −14,2 kJ/mol para a reação da PFK-1, calcule a constante de equilíbrio dessa reação.

(c) Compare os valores de $Q$ e $K'_{eq}$. A reação fisiológica está longe ou próxima do equilíbrio? Explique. O que este experimento sugere sobre o papel da PFK-1 como enzima reguladora?

**2. Todas as reações metabólicas estão em equilíbrio?**
(a) O fosfoenolpiruvato (PEP) é um dos dois doadores de grupos fosforil na síntese de ATP durante a glicólise. Nos eritrócitos humanos, a concentração do ATP no estado estável é 2,24 mM, a do ADP é 0,25 mM, e a do piruvato é 0,051 mM. Calcule a concentração de PEP a 25°C, supondo que a reação da piruvato-cinase (ver Figura 13-13) está em equilíbrio na célula.

(b) A concentração fisiológica de PEP nos eritrócitos humanos é 0,023 mM. Compare-a com o valor obtido em (a). Explique o significado dessa diferença.

**3. Efeito do suprimento de $O_2$ sobre a velocidade da glicólise.** As etapas reguladas da glicólise na célula intacta podem ser identificadas pelo estudo do catabolismo da glicose nos tecidos ou nos órgãos inteiros. Por exemplo, o consumo de glicose pelo músculo cardíaco pode ser medido pela circulação artificial de sangue através de um coração intacto isolado e pela medida da concentração da glicose antes e depois de o sangue passar pelo coração. Se o sangue circulante é desoxigenado, o músculo cardíaco consome glicose em uma velocidade constante. Quando se adiciona oxigênio ao sangue, a velocidade do consumo de glicose diminui drasticamente, sendo então mantida na velocidade mais baixa. Explique.

**4. Regulação da PFK-1.** O efeito do ATP sobre a enzima alostérica PFK-1 está mostrado abaixo. Para certa concentração de frutose-6-fosfato, a atividade da PFK-1 aumenta com o aumento da concentração de ATP, até um ponto além do qual o aumento da concentração do ATP inibe a enzima.

(a) Explique como o ATP pode ser tanto substrato como inibidor para a PFK-1. Como a enzima é regulada por ATP?

(b) De que forma a glicólise é regulada pelos níveis de ATP?

(c) A inibição da PFK-1 pelo ATP diminui quando a concentração de ADP é alta, conforme mostrado na ilustração. Como essa observação pode ser explicada?

**5. Concentração celular de glicose.** A concentração da glicose no plasma sanguíneo humano é mantida em cerca de 5 mM. A concentração da glicose livre dentro de um miócito é muito mais baixa. Por que a concentração na célula é tão baixa? O que acontece com a glicose após entrar na célula? A glicose é administrada intravenosamente como fonte de alimento em determinadas situações clínicas. Dado que a transformação da glicose em glicose-6-fosfato consome ATP, por que não administrar glicose-6-fosfato?

**6. Atividade enzimática e função fisiológica.** A $V_{máx}$ da glicogênio-fosforilase do músculo esquelético é muito maior do que a $V_{máx}$ da mesma enzima do tecido hepático.
(a) Qual é a função fisiológica da glicogênio-fosforilase no músculo esquelético? E no tecido hepático?
(b) Por que a $V_{máx}$ da enzima do músculo precisa ser maior do que a da enzima do fígado?

**7. Equilíbrio da glicogênio-fosforilase.** A glicogênio-fosforilase catalisa a remoção de glicose do glicogênio. O $\Delta G'^\circ$ para esta reação é 3,1 kJ/mol.

(a) Calcule a razão entre a [$P_i$] e a [glicose-1-fosfato] quando a reação está em equilíbrio. (Dica: A remoção de unidades de glicose do glicogênio não altera a concentração do glicogênio.)

(b) A razão [$P_i$]/[glicose-1-fosfato] medida nos miócitos em condições fisiológicas é maior que 100:1. O que isso indica a respeito da direção do fluxo metabólico pela reação da glicogênio-fosforilase no músculo?

(c) Por que as razões no equilíbrio e em condições fisiológicas são diferentes? Qual é o possível significado para essa diferença?

**8. Regulação da glicogênio-fosforilase.** No tecido muscular, a taxa de conversão do glicogênio em glicose-6-fosfato é determinada pela razão entre a fosforilase *a* (ativa) e a fosforilase *b* (menos ativa). Determine o que acontece à taxa de degradação do glicogênio se uma preparação de músculo contendo glicogênio-fosforilase for tratada com (a) fosforilase-cinase e ATP; (b) PP1; (c) adrenalina.

**9. Degradação do glicogênio em músculo de coelho.** O uso intracelular da glicose e do glicogênio é rigidamente regulado em quatro pontos. Para comparar a regulação da glicólise com oxigênio abundante e escasso, considere a utilização da glicose e do glicogênio pelo músculo da perna de coelho em duas condições fisiológicas: coelho em repouso, com baixa demanda por ATP, e coelho que vê seu inimigo mortal, o coiote, e dispara para sua toca. Para cada condição determine os níveis relativos (alto, intermediário, baixo) de AMP, ATP, citrato e acetil-CoA e descreva como esses níveis afetam o fluxo de metabólitos pela glicólise com a regulação de enzimas específicas. Em períodos de estresse, o músculo da perna do coelho produz a maior parte do ATP por glicólise anaeróbia (fermentação a lactato) e muito pouco por oxidação da acetil-CoA derivada da degradação das gorduras.

**10. A degradação do glicogênio em pássaros migratórios.** Ao contrário do coelho e sua corrida curta, os pássaros migratórios requerem energia por longos períodos de tempo. Os patos, por exemplo, geralmente voam vários milhares de quilômetros durante sua migração anual. Os músculos de voo dos pássaros migratórios têm alta capacidade oxidativa e obtêm o ATP necessário por meio da oxidação da acetil-CoA (obtida das gorduras) via ciclo do ácido cítrico. Compare a regulação da glicólise no músculo durante intensa atividade de curta duração, como no caso do coelho em fuga, e durante uma atividade prolongada, como no caso do pato migratório. Por que a regulação deve ser diferente nestes dois casos?

**11. Defeitos enzimáticos no metabolismo dos carboidratos.** Segue-se o resumo do estudo de quatro casos clínicos. Determine, para cada caso, qual enzima está com defeito e indique, a partir da lista fornecida no final do problema, o tratamento apropriado. Justifique suas escolhas. Responda às perguntas em cada estudo de caso. (Talvez você necessite recorrer a informações do Capítulo 14.)

*Caso A* O paciente apresenta vômito e diarreia logo após a ingestão de leite. O teste de tolerância à lactose é realizado. (O paciente ingere uma quantidade padrão de lactose, e as concentrações plasmáticas de glicose e de galactose são medidas a intervalos. Nas pessoas com metabolismo de carboidratos normal, os níveis aumentam até o máximo em cerca de 1 hora, e então diminuem.) As concentrações sanguíneas de glicose e de galactose do paciente não aumentaram durante o teste. Por que a glicose e a galactose aumentam no sangue e depois diminuem durante o teste em pessoas saudáveis? Por que não aumentam no paciente?

*Caso B* O paciente apresenta vômito e diarreia após a ingestão de leite. No seu sangue foi encontrada uma baixa concentração de glicose, mas uma concentração muito mais alta do que o normal de açúcares redutores. O exame de urina deu positivo para galactose. Por que a concentração de açúcares redutores está alta no sangue? Por que a galactose aparece na urina?

*Caso C* O paciente se queixa de cãibras musculares doloridas quando executa exercício físico extenuante, mas não tem outros sintomas. Uma biópsia de músculo indica concentração de glicogênio muito mais alta do que o normal. Por que o glicogênio se acumula?

*Caso D* O paciente está letárgico, seu fígado está aumentado, e uma biópsia do órgão mostra quantidade excessiva de glicogênio. Ele também tem um nível de glicose sanguínea mais baixo do que o normal. Qual é a razão da glicose sanguínea baixa neste paciente?

*Enzima com defeito*
(a) PFK-1 muscular
(b) Fosfomanose-isomerase
(c) Galactose-1-fosfato-uridiltransferase
(d) Glicogênio-fosforilase hepática
(e) Triose-cinase
(f) Lactase da mucosa intestinal
(g) Maltase da mucosa intestinal
(h) Enzima de desramificação muscular

*Tratamento*
1. Corrida diária de 5 km
2. Dieta livre de gorduras
3. Dieta com baixa lactose
4. Evitar exercícios extenuantes
5. Grandes doses de niacina (o precursor de $NAD^+$)
6. Alimentação frequente (pequenas porções) de uma dieta normal

**12. Efeitos da insuficiência de insulina em uma pessoa diabética.** Um homem com diabetes dependente de insulina é levado à emergência em estado quase comatoso. Enquanto passava férias em um local isolado, ele perdeu a medicação de insulina e estava há dois dias sem tomar o hormônio.

(a) Para cada tecido listado abaixo, cada uma das vias está mais rápida, mais lenta, ou inalterada neste paciente, em comparação com o nível normal obtido pela administração de quantidades apropriadas de insulina?

(b) Para cada via, descreva pelo menos um mecanismo de controle responsável pela mudança prevista.

*Tecido e via*
1. Adiposo: síntese de ácidos graxos
2. Muscular: glicólise; síntese de ácidos graxos; síntese de glicogênio
3. Hepático: glicólise; gliconeogênese; síntese de glicogênio; síntese de ácidos graxos; via das pentoses-fosfato

**13. Metabólitos sanguíneos na insuficiência de insulina.** Prediga, para o paciente descrito no Problema 12, os níveis dos seguintes metabólitos no seu sangue *antes* do tratamento na emergência em relação aos níveis mantidos durante o tratamento com insulina: (a) glicose; (b) corpos cetônicos; (c) ácidos graxos livres.

**14. Efeitos metabólicos de enzimas mutantes.** Prediga e explique o efeito de cada um dos seguintes defeitos, causados por mutações, sobre o metabolismo do glicogênio: (a) perda do sítio de ligação ao cAMP na subunidade reguladora da proteína-cinase A (PKA); (b) perda do inibidor da proteína-fosfatase (inibidor 1 na Figura 15-42); (c) superexpressão da fosforilase-cinase *b* no fígado; (d) receptores de glucagon alterados no fígado.

**15. Controle hormonal do metabolismo energético.** Entre o seu jantar e o café da manhã, sua glicose sanguínea diminui e seu fígado torna-se um produtor de glicose em

vez de consumidor. Descreva a base hormonal para essa troca, e explique como a mudança hormonal desencadeia a produção de glicose pelo fígado.

**16. Metabolismo alterado em camundongos manipulados geneticamente.** Os pesquisadores podem manipular os genes de um camundongo de forma que um único gene em um único tecido produz ou uma proteína inativa (camundongo nocaute) ou uma proteína sempre (constitutivamente) ativa. Que efeitos sobre o metabolismo podem ser previstos para camundongos com as seguintes alterações genéticas: (a) nocaute da enzima de desramificação do glicogênio no fígado; (b) nocaute da hexocinase IV no fígado; (c) nocaute da FBPase-2 no fígado; (d) FBPase constitutivamente ativa no fígado; (e) AMPK constitutivamente ativa no músculo; (f) ChREBP constitutivamente ativa no fígado?

## Problema de análise de dados

**17. Estrutura ótima do glicogênio.** As células musculares precisam de acesso rápido a grandes quantidades de glicose durante o exercício intenso. Esta glicose é armazenada no fígado e no músculo esquelético na forma polimérica como partículas de glicogênio. A partícula típica contém cerca de 55.000 resíduos de glicose (ver Figura 15-35b). Meléndez-Hevia, Waddell e Shelton (1993) exploraram alguns aspectos teóricos da estrutura do glicogênio, conforme descrito neste problema.

(a) A concentração celular de glicogênio no fígado é de cerca de 0,01 $\mu$M. Que concentração celular de glicose livre seria necessária para armazenar uma quantidade equivalente de glicose? Por que essa concentração de glicose representa um problema para a célula?

A glicose é liberada do glicogênio pela glicogênio-fosforilase, enzima que pode remover moléculas de glicose, uma de cada vez, da extremidade de uma cadeia de glicogênio. As cadeias de glicogênio são ramificadas (ver Figuras 15-28 e 15-35b), e o grau de ramificação – o número de ramificações por cadeia – tem uma influência poderosa sobre a velocidade com que a glicogênio-fosforilase libera glicose.

(b) Por que um grau de ramificação muito baixo (isto é, abaixo de um nível ótimo) reduz a velocidade de liberação de glicose? (Dica: Considere o caso extremo de uma cadeia não ramificada com 55.000 resíduos de glicose.)

(c) Por que um grau de ramificação muito alto também reduz a velocidade de liberação de glicose? (Dica: Pense nas restrições físicas.)

Meléndez-Hevia e colaboradores fizeram uma série de cálculos e chegaram à conclusão que duas ramificações por cadeia (ver Figura 15-35b) são o número ótimo para as restrições descritas acima. Isso é o que se encontra no glicogênio armazenado no músculo e no fígado.

Para determinar o número ótimo de resíduos de glicose por cadeia, Meléndez-Hevia e colaboradores consideraram dois parâmetros-chave que definem a estrutura de uma partícula de glicogênio: $t$ = número de camadas de cadeias de glicose em uma partícula (a molécula da Figura 15-35b tem cinco camadas); $g_c$ = número de resíduos de glicose em cada cadeia. Eles decidiram encontrar os valores de $t$ e $g_c$ que poderiam maximizar três quantidades: (1) a quantidade de glicose armazenada na partícula ($G_T$) por unidade de volume; (2) o número de cadeias de glicose não ramificadas ($C_A$) por unidade de volume (i.e., o número de cadeias na camada mais externa, acessível à glicogênio-fosforilase); e (3) a quantidade de glicose disponível para a fosforilase nestas cadeias não ramificadas ($G_{PT}$).

(d) Mostre que $C_A = 2^{t-1}$. Esse é o número de cadeias disponíveis para a glicogênio-fosforilase antes da ação da enzima de desramificação.

(e) Mostre que $C_T$, o número total de cadeias na partícula, é dado por $C_T = 2^t - 1$. Assim $G_T = g_c(C_T) = g_c(2^t - 1)$, o número total de resíduos de glicose na partícula.

(f) A glicogênio-fosforilase não pode remover glicoses de cadeias de glicogênio que tenham menos de cinco resíduos de glicose. Mostre que $G_{PT} = (g_c - 4)(2^{t-1})$. Essa é a quantidade de glicose disponível para a glicogênio-fosforilase.

(g) Com base no tamanho dos resíduos de glicose e na localização das ramificações, a espessura de uma camada de glicogênio é 0,12 $g_c$ nm + 0,35 nm. Mostre que o volume de uma partícula, $V_s$, é dado pela equação $V_s = \frac{4}{3}\pi t^3(0{,}12g_c + 0{,}35)^3$ nm$^3$.

Meléndez-Hevia e colaboradores determinaram então os valores ótimos de $t$ e $g_c$ – aqueles que dão o valor máximo para a função de qualidade, que maximiza $G_T$, $C_A$ e $G_{PT}$, enquanto minimiza $V_S$: $f = \frac{G_T C_A G_{PT}}{V_S}$. Eles constataram que o valor ótimo de $g_c$ é independente de $t$.

(h) Escolha um valor de $t$ entre 5 e 15 para encontrar o valor máximo de $g_c$. Como esse valor é comparado com o de $g_c$ encontrado no glicogênio hepático (ver Figura 15-35b)? (Dica: Talvez seja útil usar um programa de planilha.)

### Referência

**Meléndez-Hevia, E., Waddell, T.G., & Shelton, E.D.** (1993) Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule. *Biochem. J.* **295**, 477–483.

16

# Ciclo do Ácido Cítrico



Como foi visto no Capítulo 14, algumas células obtêm energia (ATP) pela fermentação, degradando a glicose na ausência de oxigênio. Para a maioria das células eucarióticas e muitas bactérias, que vivem em condições aeróbias e oxidam os combustíveis orgânicos a dióxido de carbono e água, a glicólise é apenas a primeira etapa para a oxidação completa da glicose. Em vez de ser reduzido a lactato, etanol ou algum outro produto da fermentação, o piruvato produzido pela glicólise é posteriormente oxidado a $H_2O$ e $CO_2$. Essa fase aeróbia do catabolismo é chamada de **respiração**. No sentido fisiológico ou macroscópico mais amplo, respiração alude à captação de $O_2$ e eliminação de $CO_2$ por organismos multicelulares. Bioquímicos e biólogos celulares, entretanto, utilizam esse termo em um sentido mais estrito para referirem-se ao processo molecular por meio do qual as *células* consomem $O_2$ e produzem $CO_2$ – processo mais precisamente denominado **respiração celular**.

A respiração celular acontece em três estágios principais (**Figura 16-1**). No primeiro, moléculas combustíveis orgânicas – glicose, ácidos graxos e alguns aminoácidos – são oxidadas para produzirem fragmentos de dois carbonos, na forma do grupo acetil da acetil-coenzima A (acetil-CoA). No segundo estágio, os grupos acetil entram no ciclo do ácido cítrico, que os oxida enzimaticamente a $CO_2$; a energia liberada é conservada nos transportadores de elétrons reduzidos NADH e $FADH_2$. No terceiro estágio da respiração, estas coenzimas reduzidas são oxidadas, doando prótons ($H^+$) e elétrons. Os elétrons são transferidos ao $O_2$ – o aceptor final de elétrons – por meio de uma cadeia de moléculas transportadoras de elétrons, conhecida como cadeia respiratória. No curso da transferência de elétrons, a grande quantidade de energia liberada é conservada na forma de ATP, por um processo chamado de fosforilação oxidativa (Capítulo 19). A respiração é mais complexa do que a glicólise e acredita-se que tenha evoluído muito mais tardiamente, após o surgimento das cianobactérias. As atividades metabólicas das cianobactérias são responsáveis pelo aumento dos níveis de oxigênio na atmosfera terrestre, um momento decisivo na história evolutiva.

Primeiro será abordada a conversão de piruvato a grupos acetil e, então, a entrada destes grupos no **ciclo do ácido cítrico**, também chamado de **ciclo do ácido tricarboxílico** (**TCA**, de *tricarboxylic acid*) ou **ciclo de Krebs** (em homenagem ao seu descobridor, Hans Krebs). A seguir, serão examinadas as reações do ciclo e as enzimas que as catalisam. Já que os intermediários do ciclo do ácido cítrico também são desviados como precursores biossintéticos, serão consideradas algumas maneiras pelas quais esses intermediários são repostos. O ciclo do ácido cítrico é um pivô do metabolismo, com vias catabólicas chegando e vias anabólicas partindo, sendo cuidadosamente regulado em coordenação com outras vias. O capítulo termina com uma descrição da via do glioxilato, uma sequência metabólica presente em certos organismos que utiliza algumas das mesmas enzimas e reações utilizadas pelo ciclo do ácido cítrico, causando a síntese líquida de glicose a partir dos triacilgliceróis armazenados.

Hans Krebs, 1900-1981

## 16.1 Produção de acetil-CoA (acetato ativado)

Em organismos aeróbios, glicose e outros açúcares, ácidos graxos e a maioria dos aminoácidos são finalmente oxidados a $CO_2$ e $H_2O$ pelo ciclo do ácido cítrico e pela cadeia respiratória. Antes de entrarem no ciclo do ácido cítrico, os esqueletos de carbono dos açúcares e ácidos graxos são convertidos ao grupo acetil da acetil-CoA, a forma na qual a maioria dos combustíveis entra no ciclo. Os carbonos de muitos aminoácidos também entram no ciclo dessa maneira, embora alguns aminoácidos sejam convertidos a outros intermediários do ciclo. Aqui, o foco será em como o piruvato, derivado da glicose e de outros açúcares pela glicólise,

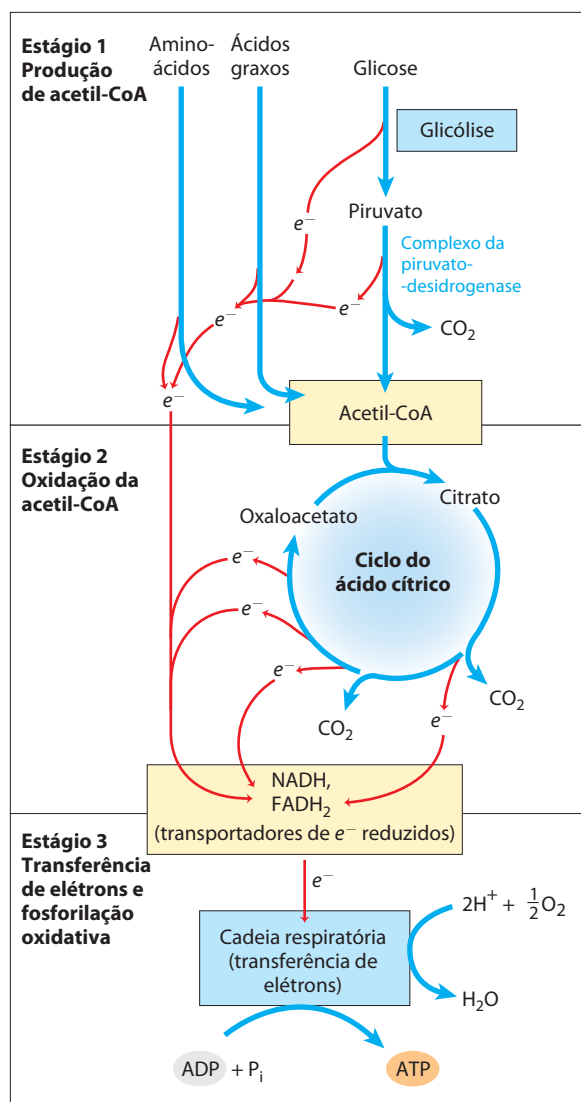



**FIGURA 16-1 Catabolismo de proteínas, gorduras e carboidratos durante os três estágios da respiração celular.** Estágio 1: a oxidação de ácidos graxos, glicose e alguns aminoácidos gera acetil-CoA. Estágio 2: a oxidação dos grupos acetil no ciclo do ácido cítrico inclui quatro etapas nas quais os elétrons são removidos. Estágio 3: os elétrons carreados por NADH e $FADH_2$ convergem para uma cadeia de transportadores de elétrons mitocondrial (ou, em bactérias, ligados à membrana plasmática) – a cadeia respiratória – reduzindo, no final, $O_2$ a $H_2O$. Este fluxo de elétrons impele a produção de ATP.

é oxidado a acetil-CoA e $CO_2$ pelo **complexo da piruvato--desidrogenase** (**PDH**, de *pyruvate dehydrogenase*), um grupo de enzimas – múltiplas cópias de três enzimas – localizado nas mitocôndrias de células eucarióticas e no citosol de bactérias.

O exame cuidadoso desse complexo enzimático é gratificante sob diversos aspectos. O complexo da PDH é um exemplo clássico e muito estudado de um complexo multienzimático no qual uma série de intermediários químicos permanece ligada às moléculas de enzima à medida que o substrato é transformado no produto final. Cinco cofatores, quatro derivados de vitaminas, participam do mecanismo da reação. A regulação desse complexo enzimático também ilustra como uma combinação de modificações covalentes e mecanismos alostéricos resulta em um fluxo precisamente regulado em uma etapa metabólica. Finalmente, o complexo da PDH é o protótipo para dois outros importantes complexos enzimáticos: $\alpha$-cetoglutarato-desidrogenase, do ciclo do ácido cítrico, e $\alpha$-cetoácido-desidrogenase de cadeia ramificada, das vias de oxidação de alguns aminoácidos (ver Figura 18-28). A notável similaridade na estrutura de proteínas, na exigência de cofator e nos mecanismos de reação desses três complexos inquestionavelmente reflete uma origem evolutiva comum.

## O piruvato é oxidado a acetil-CoA e $CO_2$

A reação geral catalisada pelo complexo da piruvato-desidrogenase é uma **descarboxilação oxidativa**, um processo de oxidação irreversível no qual o grupo carboxil é removido do piruvato na forma de uma molécula de $CO_2$, e os dois carbonos remanescentes são convertidos ao grupo acetil da acetil-CoA (**Figura 16-2**). O NADH formado nessa reação doa um íon hidreto (**:**$H^-$) para a cadeia respiratória (Figura 16-1), que transferirá os dois elétrons ao oxigênio ou, em microrganismos anaeróbios, a um aceptor de elétrons alternativo, como nitrato ou sulfato. A transferência de elétrons do NADH ao oxigênio gera, ao final, 2,5 moléculas de ATP por par de elétrons. A irreversibilidade da reação do complexo da PDH foi demonstrada por experimentos com marcação isotópica: o complexo não pode religar $CO_2$ radioativamente marcado à acetil-CoA para formar uma molécula de piruvato com o carboxil marcado.

## O complexo da piruvato-desidrogenase requer cinco coenzimas

A combinação de desidrogenação e descarboxilação do piruvato ao grupo acetil da acetil-CoA (Figura 16-2) requer a ação sequencial de três enzimas diferentes e cinco coenzimas diferentes ou grupos prostéticos – pirofosfato de tiamina (TPP, de *thiamine pyrophosphate*), dinucleotídeo de flavina-adenina (FAD, de *flavin adenine dinucleotide*), coenzima A (CoA, algumas vezes denominada CoA-SH, para enfatizar a função do grupo —SH), dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (NAD, de *nicotinamide adenine dinucleotide*) e lipoato. Quatro vitaminas diferentes essenciais à nutrição humana são componentes vitais desse sistema: tiamina (no TPP), riboflavina (no FAD), niacina (no NAD)

Piruvato + CoA-SH + $NAD^+$ → (TPP, lipoato, FAD; Complexo da piruvato-desidrogenase ($E_1 + E_2 + E_3$)) → Acetil-CoA + NADH + $CO_2$

$\Delta G'^{\circ} = -33{,}4$ kJ/mol

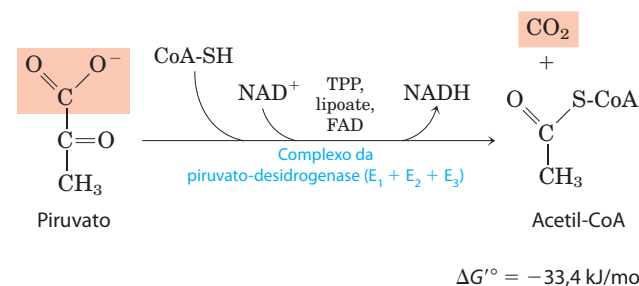



**FIGURA 16-2 Reação geral catalisada pelo complexo da piruvato--desidrogenase.** As cinco enzimas participantes desta reação e as três enzimas que formam o complexo são discutidas no texto.

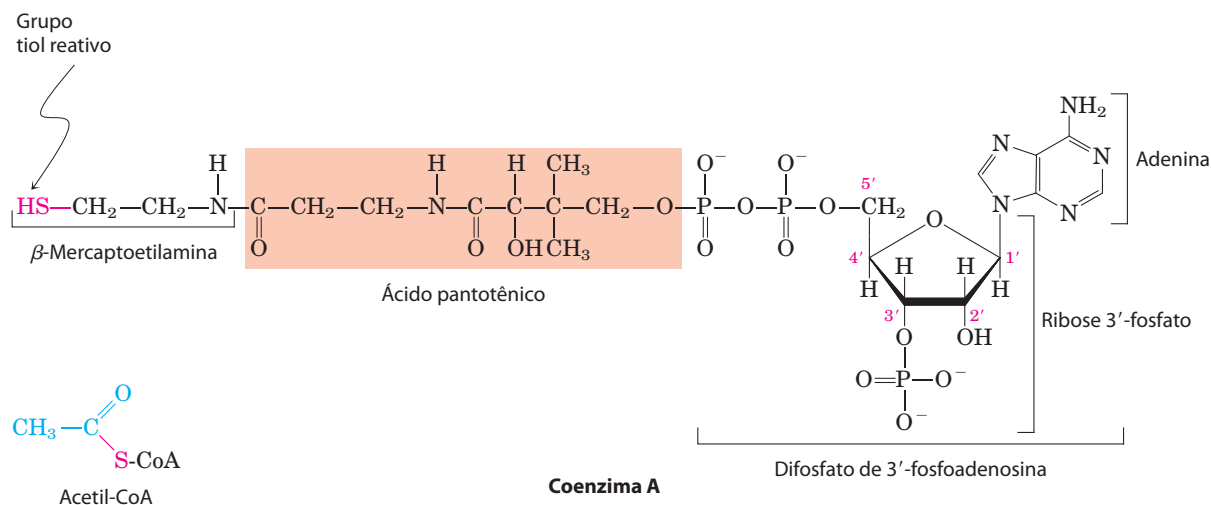



**FIGURA 16-3** **Coenzima A (CoA).** Um grupo hidroxil do ácido pantotênico está unido a uma molécula de ADP modificada por uma ligação fosfoéster, e seu grupo carboxil está ligado à β-mercaptoetilamina por uma ligação amida. O grupo hidroxil na posição 3′ da molécula de ADP tem um grupo fosfato que não está presente no ADP livre. O grupo —SH da molécula de mercaptoetilamina forma um tioéster com o acetato para formar a acetil-coenzima A (acetil-CoA) (à esquerda, embaixo).

e pantotenato (na CoA). Foram descritas anteriormente as funções de FAD e NAD como transportadores de elétrons (Capítulo 13) e verificou-se que o TPP era a coenzima da piruvato-descarboxilase (ver Figura 14-15).

A coenzima A (**Figura 16-3**) tem um grupo tiol reativo (—SH) que é crucial para a função da CoA como transportador de acilas em diferentes reações metabólicas. Grupos acil são covalentemente ligados ao grupo tiol, formando **tioésteres**. Devido às energias de ativação padrão relativamente altas (ver Figuras 13-16, 13-17), os tioésteres têm um alto potencial para a transferência do grupo acil e podem doar estes grupos a diversas moléculas aceptoras. O grupo acil unido à coenzima A pode, portanto, ser considerado "ativado" para transferência.

O quinto cofator do complexo da PDH, o **lipoato** (**Figura 16-4**), tem dois grupos tiol que podem ser reversivelmente oxidados por uma ligação dissulfeto (—S—S—), similar àquela entre dois resíduos de Cys em uma proteína. Devido à sua capacidade de participar de reações de oxidação e redução, o lipoato atua como transportador de elétrons (hidrogênio) e como transportador de acilas, como será visto.

## O complexo da piruvato-desidrogenase consiste em três enzimas distintas

O complexo da PDH contém três enzimas – **piruvato-desidrogenase** ($E_1$), **di-hidrolipoil-transacetilase** ($E_2$) e **di-hidrolipoil-desidrogenase** ($E_3$) – cada uma presente em múltiplas cópias. O número de cópias de cada enzima e, portanto, o tamanho do complexo varia entre espécies. O complexo da PDH isolado de mamíferos apresenta um diâmetro de cerca de 50 nm – mais de cinco vezes o tamanho de um ribossomo inteiro e grande o suficiente para ser visto por microscopia eletrônica (**Figura 16-5a**). Na enzima bovina, 60 cópias idênticas de $E_2$ formam um dodecaedro pentagonal (o centro) com um diâmetro de aproximadamente 25 nm (Figura 16-5b). (O centro da enzima de *Escherichia coli* contém 24 cópias de $E_2$.) $E_2$ é o ponto de conexão para o grupo prostético lipoato, unido ao grupo ε-amino de um resíduo de Lys por uma ligação amida (Figura 16-4). $E_2$ tem três domínios funcionalmente distintos (Figura 16-5c): o *domínio lipoil* na porção aminoterminal, contendo o(s) resíduo(s) de lipoil-Lys; o *domínio de ligação* a $E_1$ e $E_3$ na porção central; e o *domínio aciltransferase* na porção central mais interna, o qual contém o sítio ativo da aciltransferase. O complexo da PDH de levedura tem um único domínio lipoil ligado ao lioato, mas o complexo em mamíferos tem dois e, em *E. coli*, três (Figura

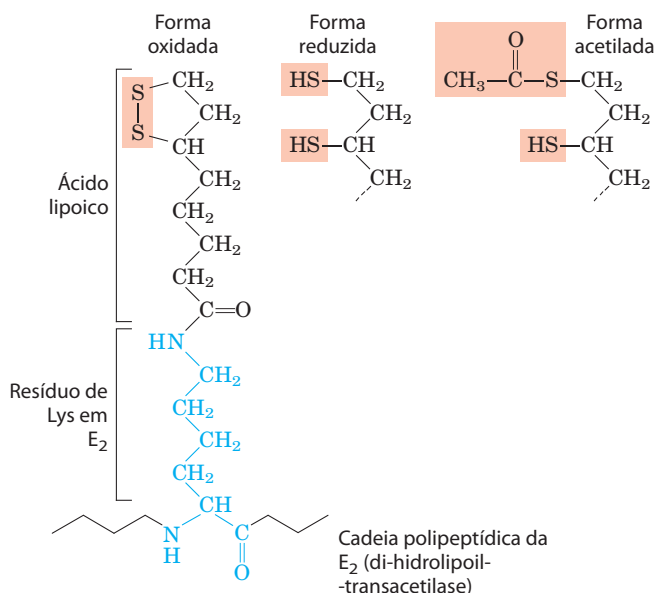



**FIGURA 16-4** **Ácido lipoico (lipoato) em ligação amida com um resíduo de Lys.** A porção lipoil-lisina é o grupo prostético da di-hidrolipoil-transacetilase ($E_2$ do complexo da PDH). O grupo lipoil ocorre na forma oxidada (dissulfeto) e reduzida (ditiol) e atua como transportador de hidrogênio e grupo acetil (ou outro grupo acil).

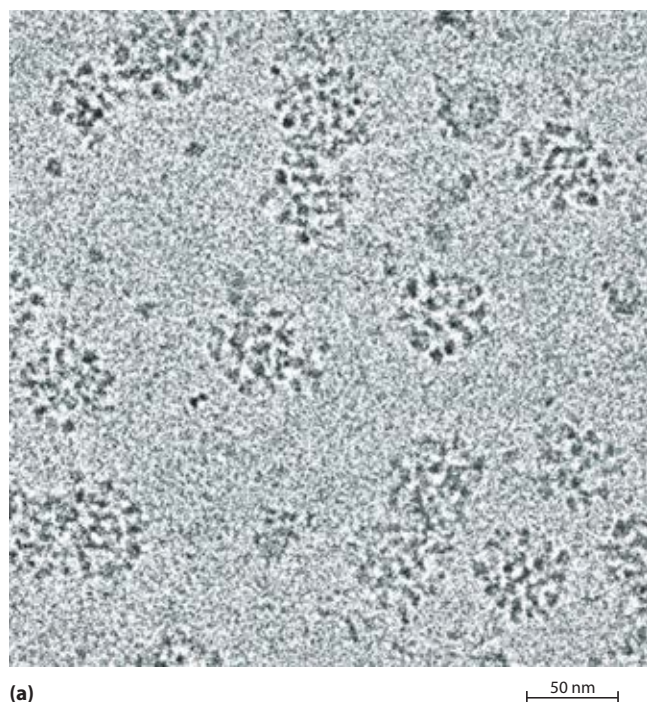
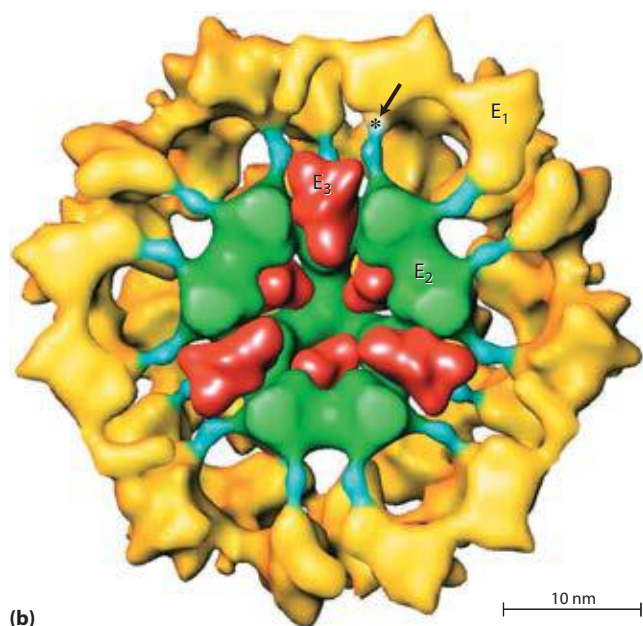
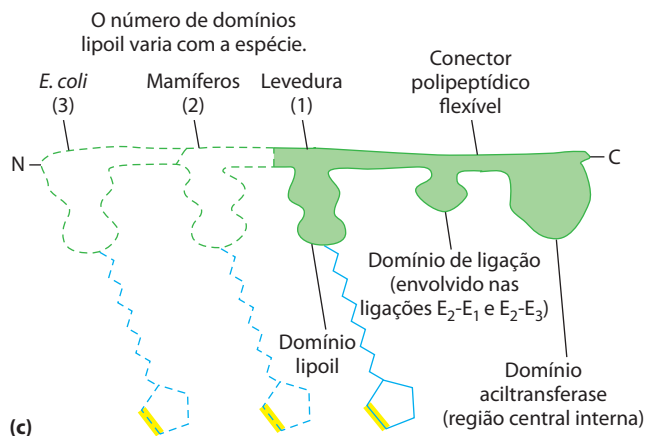



**FIGURA 16-5 Complexo da piruvato-desidrogenase. (a)** Micrografia crioeletrônica de complexos da PDH isolados de rins de bovino. Na microscopia crioeletrônica, as amostras biológicas são visualizadas em temperaturas extremamente baixas; isto evita os potenciais artefatos introduzidos pelos processos usuais de desidratação, fixação e coloração. **(b)** Imagem tridimensional do complexo da PDH, mostrando a estruturação das subunidades: $E_1$, piruvato-desidrogenase; $E_2$, di-hidrolipoil-transacetilase; e $E_3$, di-hidrolipoil-desidrogenase. Esta imagem foi reconstruída pela análise de um grande número de imagens como aquelas em (a), em combinação com estudos cristalográficos das subunidades individuais. O centro (em verde) consiste em 60 moléculas de $E_2$, arranjadas em 20 trímeros que formam um dodecaedro pentagonal. O domínio lipoil de $E_2$ (em azul) estende-se para fora para conectar-se aos sítios ativos das moléculas de $E_1$ (em amarelo) arranjadas ao redor do centro de $E_2$. Algumas subunidades $E_3$ (em vermelho) também estão unidas ao centro, no qual um braço flexível de $E_2$ pode alcançar seus sítios ativos. Um asterisco marca o local onde um grupo lipoil está ligado ao domínio lipoil de $E_2$. Para tornar a estrutura mais clara, aproximadamente metade da porção frontal do complexo foi removida. Este modelo foi preparado por Z.H. Zhou e colaboradores (2001); em outro modelo, proposto por J.L.S. Milne e colaboradores (2002), as subunidades de $E_3$ estão localizadas mais perifericamente (ver Leituras Adicionais). **(c)** $E_2$ consiste em três tipos de domínios conectados por polipeptídeos curtos: um domínio catalítico aciltransferase; um domínio de ligação, envolvido na ligação de $E_2$ a $E_1$ e $E_3$; e um ou mais (dependendo da espécie) domínios lipoil.

16-5c). Os domínios de $E_2$ são separados por conectores, sequências de 20 a 30 resíduos de aminoácidos, ricos em Ala e Pro e intercalados com resíduos carregados; esses conectores tendem a assumir formas estendidas, mantendo os três domínios afastados.

O sítio ativo de $E_1$ está ligado ao TPP, e o de $E_3$ está ligado ao FAD. Duas proteínas de regulação também fazem parte do complexo, uma proteína-cinase e uma fosfoproteína-fosfatase, como discutido a seguir. Essa estrutura $E_1$-$E_2$-$E_3$ básica tem sido conservada durante a evolução e é utilizada em diversas reações metabólicas similares, incluindo a oxidação do $\alpha$-cetoglutarato no ciclo do ácido cítrico (descrita a seguir) e a oxidação dos $\alpha$-cetoácidos derivados da degradação dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, isoleucina e leucina (ver Figura 18-28). Dentro de uma determinada espécie, a $E_3$ do complexo da PDH é idêntica à $E_3$ dos outros dois complexos enzimáticos. A ligação do lipoato à extremidade da cadeia lateral de uma Lys em $E_2$ gera um braço longo e flexível que pode se estender do sítio ativo de $E_1$ até os sítios ativos de $E_2$ e $E_3$, possivelmente a uma distância de 5 nm ou maior.

## Na canalização do substrato, o intermediário nunca deixa a superfície da enzima

A **Figura 16-6** mostra esquematicamente como o complexo da piruvato-desidrogenase conduz as cinco reações consecutivas para a descarboxilação e desidrogenação do piruvato. A etapa ❶ é essencialmente idêntica à reação catalisada pela piruvato-descarboxilase (ver Figura 14-15c); o C-1 do piruvato é liberado como $CO_2$, e o C-2, que no piruvato está no estado de oxidação de um aldeído, é unido ao TPP como um grupo hidroxietil. A primeira etapa é a mais lenta e, consequentemente, limita a velocidade da reação global. Ela também é o ponto no qual o complexo da PDH confirma sua especificidade ao substrato. Na etapa ❷, o grupo hidroxietil é oxidado ao nível de um ácido carboxílico (acetato). Os dois elétrons re-

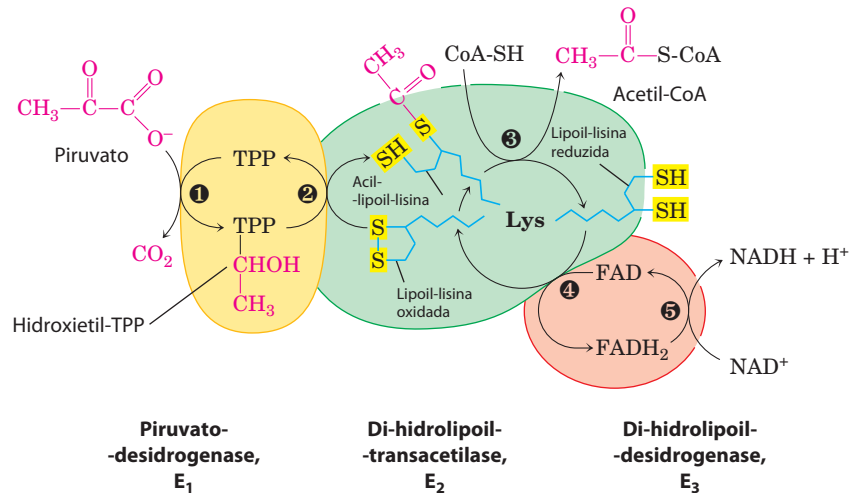



**FIGURA 16-6 Descarboxilação oxidativa do piruvato a acetil-CoA pelo complexo da PDH.** O destino da molécula de piruvato está impresso em vermelho. Na etapa ❶, o piruvato reage com o pirofosfato de tiamina (TPP) ligado à piruvato-desidrogenase ($E_1$), sendo descarboxilado ao derivado hidroxietil (ver Figura 14-15). A piruvato-desidrogenase também processa a etapa ❷, a transferência de dois elétrons e do grupo acetil a partir do TPP para a forma oxidada do grupo lipoil-lisina do centro do complexo, di-hidrolipoil-transacetilase ($E_2$), formando o acetil-tioéster do grupo lipoil reduzido. A etapa ❸ é uma transesterificação na qual o grupo —SH da CoA substitui o grupo —SH de $E_2$, produzindo acetil-CoA e a forma completamente reduzida (ditiol) do grupo lipoil. Na etapa ❹, a di-hidrolipoil-desidrogenase ($E_3$) promove a transferência de dois átomos de hidrogênio dos grupos lipoil reduzidos de $E_2$ ao grupo prostético FAD de $E_3$, restaurando a forma oxidada do grupo lipoil-lisina de $E_2$. Na etapa ❺, o $FADH_2$ reduzido de $E_3$ transfere um íon hidreto ao $NAD^+$, formando NADH. O complexo enzimático está agora pronto para outro ciclo catalítico. (As cores das subunidades correspondem àquelas na Figura 16-5b.)

movidos nessa reação reduzem a —S—S— de um grupo lipoil em $E_2$ a dois grupos tiol (—SH). O acetil produzido nesta reação de oxidação-redução é primeiramente esterificado a um dos grupos —SH do lipoil e, então, transesterificada a CoA para formar acetil-CoA (etapa ❸). Desse modo, a energia da oxidação impele a formação de um tioéster de acetato altamente energético. As reações remanescentes catalisadas pelo complexo da PDH (por $E_3$, nas etapas ❹ e ❺) são transferências de elétrons necessárias para a regeneração da forma oxidada (dissulfeto) do grupo lipoil de $E_2$, preparando o complexo enzimático para um novo ciclo de oxidação. Os elétrons removidos do grupo hidroxietil derivado do piruvato são passados ao $NAD^+$ pelo FAD.

Essenciais ao mecanismo do complexo da PDH são os braços flexíveis de lipoil-lisina de $E_2$, que recebem os dois elétrons e o grupo acetil de $E_1$ e os passam a $E_3$. Todas essas enzimas e coenzimas estão agrupadas, permitindo que os intermediários reajam rapidamente sem afastarem-se da superfície do complexo enzimático. A sequência de cinco reações mostrada na Figura 16-6 é, assim, um exemplo de **canalização do substrato**. Os intermediários da sequência em múltiplas etapas nunca deixam o complexo, e a concentração local do substrato de $E_2$ é mantida muito alta. A canalização também evita o "roubo" do grupo acetil ativado por outras enzimas que utilizam esse grupo como substrato. Como será visto, um mecanismo similar de aprisionamento da canalização do substrato entre sítios ativos é utilizado por algumas outras enzimas, com lipoato, biotina ou moléculas similares a CoA servindo como cofatores.

Como pode ser previsto, mutações nos genes das subunidades do complexo da PDH, ou uma deficiência de tiamina na dieta, podem ter graves consequências. Animais com deficiência de tiamina são incapazes de oxidar o piruvato normalmente. Isso é especialmente importante para o cérebro, que costuma obter toda sua energia por meio da oxidação aeróbia da glicose, em uma via que necessariamente inclui a oxidação do piruvato. O beri-béri, doença resultante da deficiência de tiamina, caracteriza-se pela perda da função neural. Essa doença ocorre principalmente em populações cuja dieta consiste basicamente em arroz branco (polido), que carece da casca onde a maioria da tiamina do arroz é encontrada. Pessoas que consomem habitualmente grandes quantidades de álcool também podem desenvolver deficiência de tiamina, pois a maior parte da dieta ingerida consiste nas "calorias vazias", sem vitaminas, das bebidas destiladas. Um nível de piruvato sanguíneo elevado frequentemente é um indicativo de defeitos na oxidação do piruvato devido a uma destas causas. ■

## RESUMO 16.1 Produção de acetil-CoA (acetato ativado)

- Piruvato, o produto da glicólise, é convertido a acetil-CoA, o material de partida para o ciclo do ácido cítrico, pelo complexo da piruvato-desidrogenase.
- O complexo da PDH é composto por múltiplas cópias de três enzimas: piruvato-desidrogenase, $E_1$ (ligada ao cofator TPP); di-hidrolipoil-transacetilase, $E_2$ (covalentemente ligada ao grupo lipoil); e di-hidrolipoil-desidrogenase, $E_3$ (com os cofatores FAD e NAD).
- $E_1$ catalisa a primeira descarboxilação do piruvato, produzindo hidroxietil-TPP, e então a oxidação do grupo hidroxietil a um grupo acetil. Os elétrons dessa oxidação reduzem o dissulfeto do lipoato ligado a $E_2$, e o grupo

acetil é transferido em uma ligação tioéster a um grupo —SH do lipoato reduzido.

- $E_2$ catalisa a transferência do grupo acetil para a coenzima A, formando acetil-CoA.
- $E_3$ catalisa a regeneração da forma dissulfeto (oxidada) do lipoato; os elétrons passam primeiramente ao FAD, e então ao $NAD^+$.
- Os longos braços de lipoil-lisina movem-se livremente entre o sítio ativo de $E_1$ e os sítios ativos de $E_2$ e $E_3$, prendendo os intermediários ao complexo enzimático e possibilitando a canalização do substrato.
- A organização do complexo da PDH é muito similar àquela dos complexos enzimáticos que catalisam a oxidação do $\alpha$-cetoglutarato e dos $\alpha$-cetoácidos de cadeia ramificada.

## 16.2 Reações do ciclo do ácido cítrico

Agora serão focalizados os processos por meio dos quais a acetil-CoA é oxidada. Essa transformação química é realizada pelo ciclo do ácido cítrico, a primeira via *cíclica* descoberta (**Figura 16-7**). Para iniciar uma rodada do ciclo, a acetil-CoA doa seu grupo acetil ao composto de quatro carbonos oxaloacetato, formando o composto de seis carbonos citrato. O citrato é, em seguida, transformado a isocitrato, também uma molécula com seis carbonos, o qual é desidrogenado com a perda de $CO_2$ para produzir o composto de cinco carbonos $\alpha$-cetoglutarato (também chamado de oxoglutarato). O $\alpha$-cetoglutarato perde uma segunda molécula de $CO_2$, originando ao final o composto de quatro carbonos succinato. O succcinato é, então, convertido por quatro etapas enzimáticas ao composto de quatro carbonos oxaloacetato – que está, assim, pronto para reagir com outra molécula de acetil-CoA. Em cada rodada do ciclo entra um grupo acetil (dois carbonos) na forma de acetil-CoA, e são removidas duas moléculas de $CO_2$; uma molécula de oxaloacetato é utilizada para a formação do citrato e uma molécula de oxaloacetato é regenerada. Não ocorre nenhuma remoção líquida de oxaloacetato; teoricamente, uma molécula de oxaloacetato pode participar da oxidação de um número infinito de grupos acetil, e, na verdade, o oxaloacetato está presente nas células em concentrações muito baixas. Quatro das oito etapas deste processo são oxidações, nas quais a energia da oxidação é conservada de maneira muito eficiente na forma das coenzimas reduzidas NADH e $FADH_2$.

Como mencionado antes, embora o ciclo do ácido cítrico seja fundamental ao metabolismo gerador de energia, sua função não está limitada à conservação energética. Intermediários do ciclo com quatro e cinco carbonos servem como precursores para uma ampla variedade de produtos. Para repor os intermediários removidos com este propósito, as células utilizam reações anapleróticas (de reposição), as quais são descritas a seguir.

Eugene Kennedy e Albert Lehninger mostraram em 1948 que, em eucariotos, o conjunto inteiro das reações do ciclo do ácido cítrico acontece na mitocôndria. Foi mostrado que as mitocôndrias isoladas não apenas continham todas as enzimas e coenzimas necessárias para o ciclo do ácido cítrico, mas também todas as enzimas e proteínas necessárias para o último estágio da respiração – a transferência de elétrons e a síntese de ATP pela fosforilação oxidativa. Como será visto nos capítulos posteriores, a mitocôndria também contém as enzimas para a conversão de ácidos graxos e alguns aminoácidos em acetil-CoA, e para a conversão oxidativa de outros aminoácidos em $\alpha$-cetoglutarato, succinil-CoA ou oxaloacetato. Dessa maneira, em eucariotos não fotossintéticos, a mitocôndria é o local onde ocorre a maioria das reações oxidativas geradoras de energia e a síntese acoplada de ATP. Em eucariotos fotossintéticos, a mitocôndria é o principal local de produção de ATP no escuro, porém, à luz do dia, os cloroplastos geram a maior parte do ATP desses organismos. Em bactérias, as enzimas do ciclo do ácido cítrico estão no citosol, e a membrana plasmática desempenha uma função semelhante àquela da membrana mitocondrial interna para a síntese de ATP (Capítulo 19).

### A sequência das reações do ciclo do ácido cítrico é quimicamente lógica

A acetil-CoA produzida pela quebra de carboidratos, gorduras e proteínas deve ser completamente oxidada a $CO_2$ para que o máximo da energia potencial possa ser extraído destes combustíveis. No entanto, a oxidação direta do acetato (ou da acetil-CoA) a $CO_2$ não é bioquimicamente possível. A descarboxilação deste ácido com dois carbonos produziria $CO_2$ e metano ($CH_4$). O metano é quimicamente estável, e com exceção de certas bactérias metanotróficas que crescem em nichos ricos em metano, organismos nao possuem os cofatores e enzimas necessários para a oxidação do metano. Os grupos metileno (—$CH_2$—), entretanto, são prontamente metabolizados pelos sistemas enzimáticos presentes na maioria dos organismos. Nas sequências de oxidação típicas, estão envolvidos dois grupos metileno adjacentes (—$CH_2$—$CH_2$—), sendo pelo menos um desses adjacente a um grupo carbonil. Como foi observado no Capítulo 13 (p. 513), os grupos carbonil são particularmente importantes nas transformações químicas das rotas metabólicas. O carbono do grupo carbonil tem uma carga parcial positiva devida à capacidade de atrair elétrons do oxigênio do carbonil, e é, portanto, um centro eletrofílico. Um grupo carbonil pode facilitar a formação de um carbânion em um carbono adjacente pelo deslocamento da carga negativa do carbânion. O ciclo do ácido cítrico mostra um exemplo da oxidação de um grupo metileno quando o succinato é oxidado (etapas ❻ a ❽ na Figura 16-7), formando um grupo carbonil (no oxaloacetato) que é quimicamente mais reativo do que o metano ou um grupo metileno.

Em resumo, para a acetil-CoA ser oxidada de maneira eficiente, o seu grupo metil deve estar ligado a alguma coisa. A primeira etapa do ciclo do ácido cítrico resolve elegantemente o problema do grupo metil pouco reativo por meio da condensação da acetil-CoA com o oxaloacetato. O carbonil do oxaloacetato atua como centro eletrofílico, que é atacado pelo carbono do grupo metil da acetil-CoA em uma condensação de Claisen (p. 513) para a forma-

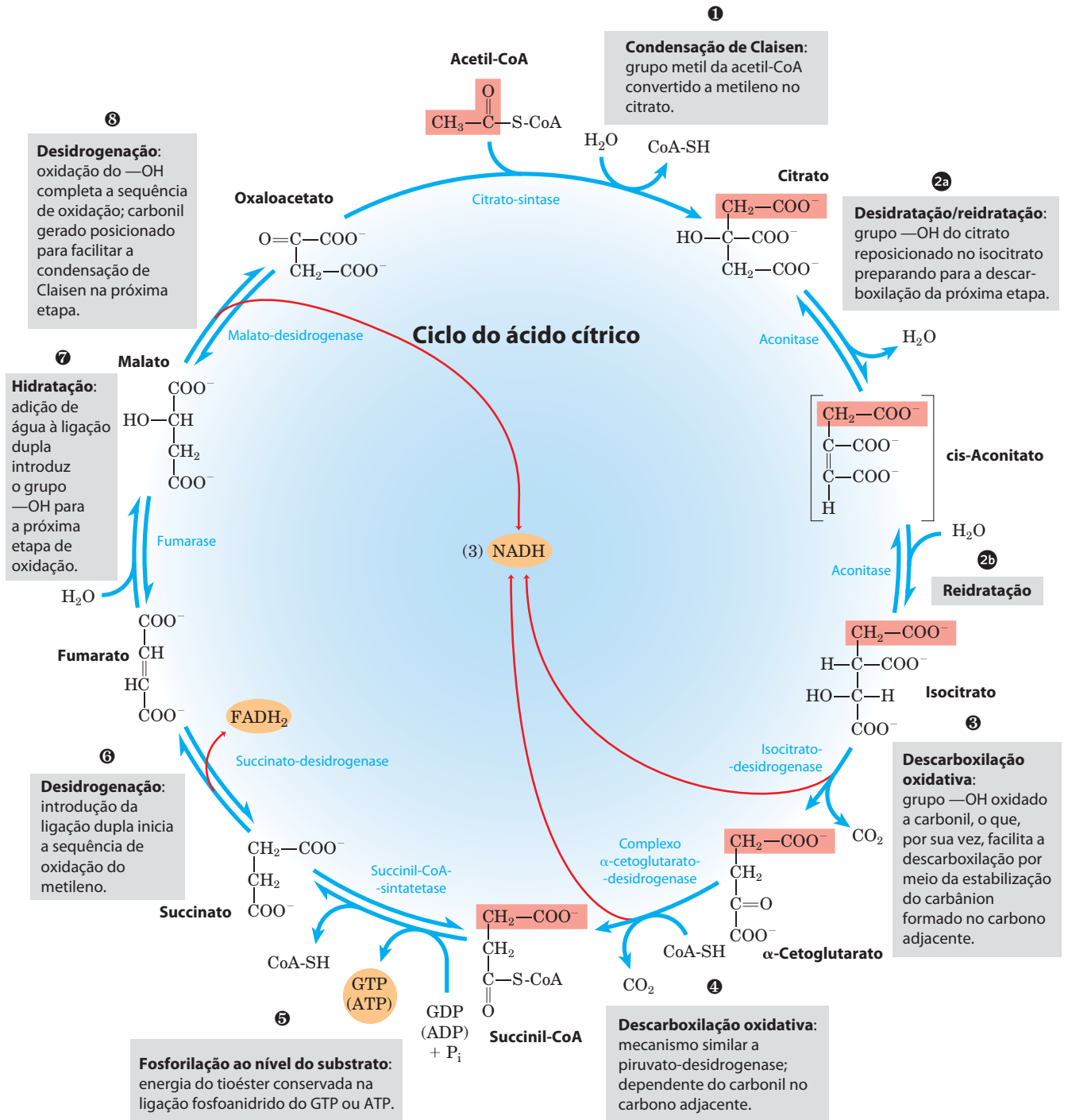



**FIGURA 16-7 Reações do ciclo do ácido cítrico.** Os átomos de carbono sombreados em cor salmão são aqueles derivados do acetato da acetil-CoA durante a primeira rodada do ciclo; estes *não* são os carbonos liberados na forma de $CO_2$ durante a primeira rodada. Observe que, no succinato e no fumarato, o grupo de dois carbonos derivado do acetato não pode mais ser especificamente indicado; como succinato e fumarato são moléculas simétricas, C-1 e C-2 são indistinguíveis de C-4 e C-3. O número ao lado de cada etapa de reação corresponde a um tópico numerado nas p. 640-647. As setas em vermelho mostram onde a energia é conservada pela transferência de elétrons ao FAD ou $NAD^+$, formando $FADH_2$ ou NADH + $H^+$. As etapas ❶, ❸ e ❹ são essencialmente irreversíveis na célula; todas as outras etapas são reversíveis. O nucleosídeo trifosfatado produzido na etapa ❺ pode ser tanto ATP quanto GTP, dependendo da isoenzima de succinil-CoA-sintetase que está catalisando a reação.

ção do citrato (etapa ❶ na Figura 16-7). O grupo metil do acetato é convertido a metileno no ácido cítrico. Esse ácido tricarboxílico, então, prontamente passa por uma série de oxidações que eliminam dois carbonos na forma de $CO_2$. Observe que todas as etapas levando à quebra ou à formação de ligações carbono-carbono (etapas ❶, ❸ e

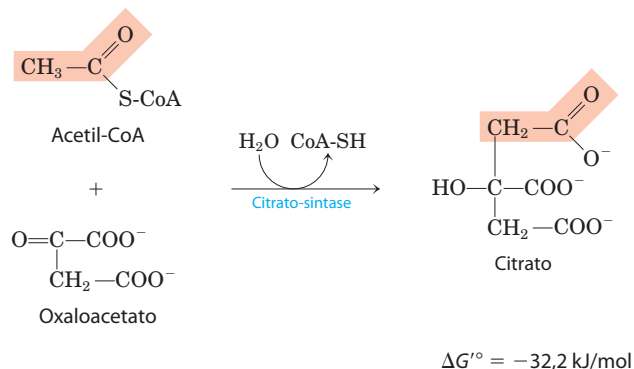
❹) dependem de grupos carbonil apropriadamente posicionados. Como em todas as rotas metabólicas, existe uma lógica química na sequência das etapas do ciclo do ácido cítrico: cada etapa envolve ou uma oxidação que conserve energia ou ela é um prelúdio necessário para a oxidação, colocando grupos funcionais em posições que facilitem a oxidação ou a descarboxilação oxidativa. À medida que for aprendendo as etapas do ciclo, relembre o raciocínio químico para cada uma; isso tornará o processo mais fácil de entender e lembrar.

## O ciclo do ácido cítrico tem oito etapas

No exame das oito etapas de reação consecutivas do ciclo do ácido cítrico, será dada especial ênfase nas transformações químicas que ocorrem à medida que o citrato formado a partir de acetil-CoA e oxaloacetato é oxidado produzindo $CO_2$ e em como a energia dessa oxidação é conservada nas coenzimas reduzidas NADH e $FADH_2$.

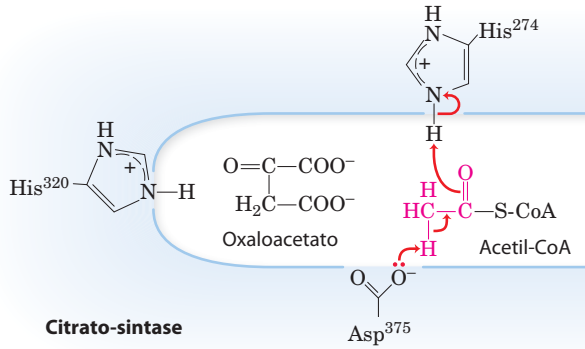
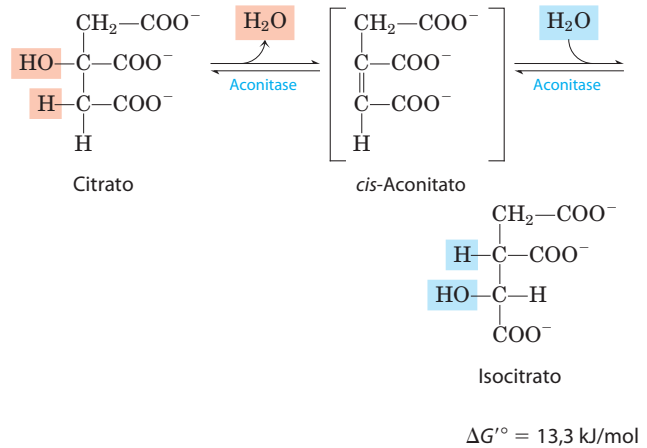
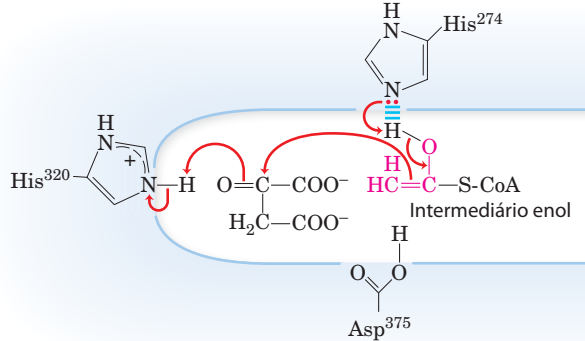
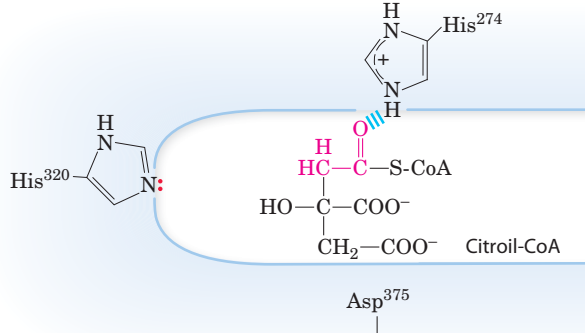
❶ **Formação do citrato.** A primeira reação do ciclo é a condensação de acetil-CoA e **oxaloacetato** para a formação do **citrato**, catalisada pela **citrato-sintase**:

$$\underset{\text{Acetil-CoA}}{\mathrm{CH_3{-}C({=}O){-}S\text{-}CoA}} + \underset{\text{Oxaloacetato}}{\mathrm{O{=}C(COO^-){-}CH_2{-}COO^-}} \xrightarrow[\text{Citrato-sintase}]{H_2O \quad \text{CoA-SH}} \underset{\text{Citrato}}{\mathrm{HO{-}C(COO^-)(CH_2{-}COO^-)(CH_2{-}C({=}O){-}O^-)}}$$

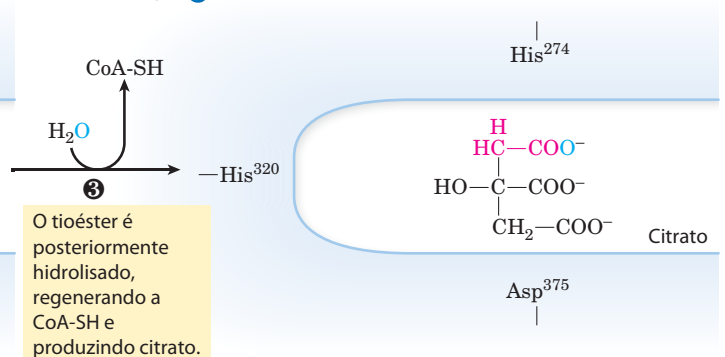
$\Delta G'^{\circ} = -32{,}2$ kJ/mol

Nessa reação, o carbono do metil do grupo acetil é unido ao grupo carbonil (C-2) do oxaloacetato. Citroil-CoA é o intermediário transitoriamente formado no sítio ativo da enzima (ver Figura 16-9). Esse intermediário é rapidamente hidrolisado em CoA livre e citrato, que são liberados do sítio ativo. A hidrólise desse intermediário tioéster de alta energia torna a reação direta altamente exergônica. A grande e negativa variação de energia livre padrão da reação da citrato-sintase é fundamental para o funcionamento do ciclo, pois, como mencionado anteriormente, a concentração de oxaloacetato normalmente é muito baixa. A CoA liberada nessa reação é reciclada para participar da descarboxilação oxidativa de outra molécula de piruvato pelo complexo PDH.

A citrato-sintase mitocondrial foi cristalizada e analisada por difração de raios X na presença e na ausência de substratos e inibidores (**Figura 16-8**). Cada subunidade dos homodímeros da enzima é um único polipeptídeo com dois domínios, um deles grande e rígido, e o outro menor e mais flexível, com o sítio ativo entre eles. Oxaloacetato, o primeiro substrato a se ligar à enzima, induz uma grande alteração conformacional no domínio flexível, criando um sítio de ligação para o segundo substrato, acetil-CoA. Quando o citroil-CoA é formado no sítio ativo da enzima, outra alteração conformacional causa a hidrólise do tioéster, liberando CoA-SH. Esse encaixe induzido da enzima, primeiro ao substrato e posteriormente ao intermediário da reação, diminui a probabilidade de que a clivagem da ligação tioéster da acetil-CoA seja prematura e improdutiva. Os estudos cinéticos da enzima são consistentes com este mecanismo bissubstrato ordenado (ver Figura 6-13). A reação catalisada pela citrato-sintase é fundamentalmente uma condensação de Claisen (p. 513), envolvendo um tioéster e uma cetona (oxaloacetato) (**Figura 16-9**).

**FIGURA 16-8 Estrutura da citrato-sintase.** O domínio flexível de cada subunidade passa por uma alteração conformacional após a ligação ao oxaloacetato, criando um sítio de ligação para a acetil-CoA. **(a)** Forma aberta da enzima isolada (PDB ID, 5CSC); **(b)** forma fechada ligada ao oxaloacetato e a um análogo estável da acetil-CoA (carboximetil-CoA) (derivada de PDB ID 5CTS). Nestas representações, uma subunidade está colorida em bege e a outra em verde.

**❷ Formação de isocitrato via *cis*-aconitato.** A enzima **aconitase** (mais formalmente, **aconitato-hidratase**) catalisa a transformação reversível do citrato a **isocitrato**, pela formação intermediária do ácido tricarboxílico ***cis*-aconitato**, o qual normalmente não se dissocia do sítio ativo. A aconitase pode promover a adição reversível de $H_2O$ à ligação dupla do *cis*-aconitato ligado à enzima de duas maneiras diferentes, uma levando a citrato e a outra a isocitrato:

Embora a mistura em equilíbrio a pH 7,4 e 25°C contenha menos de 10% de isocitrato, na célula a reação é deslocada para a direita porque o isocitrato é rapidamente consumido na próxima etapa do ciclo, o que diminui sua concentração no estado estacionário. A aconitase contém um **centro de ferro-enxofre** (**Figura 16-10**), que atua tanto na ligação do substrato ao sítio ativo quanto na adição ou na remoção catalítica de $H_2O$. Em células exauridas de ferro, a aconitase perde o centro de ferro-enxofre e adquire uma nova função na regulação da homeostase do ferro. A aconitase é uma de muitas enzimas caracterizadas por realizar mais de uma função (enzimas *moonlighting*) (Quadro 16-1).

**❸ Oxidação do isocitrato a α-cetoglutarato e $CO_2$.** Na próxima etapa, a **isocitrato-desidrogenase** catalisa a descarboxilação oxidativa do citrato para formar **α-cetoglutarato** (**Figura 16-11**). O $Mn^{2+}$ presente no sítio ativo interage

**MECANISMO-FIGURA 16-9 Citrato-sintase.** Na reação da citrato-sintase em mamíferos, o oxaloacetato liga-se primeiro, em uma sequência de reação estritamente ordenada. Esta ligação inicia uma alteração na conformação que abre o sítio de ligação para a acetil-CoA. O oxaloacetato está especificamente orientado no sítio ativo da citrato-sintase pela interação de seus dois carboxilatos com dois resíduos positivamente carregados de Arg (não mostrados aqui). **Mecanismo da citrato-sintase**

## QUADRO 16-1 Enzimas com mais de uma função

A máxima "um gene-uma enzima", formulada por George Beadle e Edward Tatum em 1940 (ver Capítulo 24), seguiu incontestada durante grande parte do século XX, assim como ocorreu com a hipótese associada de que cada proteína possui apenas uma função. Recentemente, porém, muitas exceções admiráveis a essa simples fórmula foram descobertas – situações nas quais uma única proteína codificada por um único gene é claramente ***"moonlighting"***, cumprindo mais de uma função dentro da célula. A aconitase é uma dessas proteínas: ela atua tanto como enzima quanto como regulador da síntese proteica.

As células eucarióticas têm duas isoenzimas da aconitase. A isoenzima mitocondrial converte citrato a isocitrato no ciclo do ácido cítrico. A isoenzima citosólica possui duas funções. Ela catalisa a conversão de citrato a isocitrato, fornecendo o substrato para uma isocitrato-desidrogenase citosólica que produz NADPH com poder redutor para a síntese de ácidos graxos e outros processos anabólicos no citosol. Também tem uma função na homeostase celular do ferro.

Todas as células devem obter o ferro para a atividade das muitas proteínas que o requerem como cofator. Em humanos, a deficiência grave de ferro resulta em anemia, em suprimento insuficiente de eritrócitos e em uma redução da capacidade transportadora de oxigênio que podem ser fatais. O excesso de ferro também é prejudicial: ele se deposita e danifica o fígado na hemocromatose e em outras doenças. O ferro ingerido na dieta é transportado na corrente sanguínea pela proteína **transferrina** e entra nas células por meio da endocitose mediada pelo **receptor de transferrina**. Uma vez dentro da célula, o ferro é utilizado na síntese de hemes, citocromos, proteínas Fe-S e outras proteínas dependentes de Fe, e o excesso de ferro é armazenado em ligação com a proteína **ferritina**. Os níveis de tranferrina, receptor de transferrina, e ferritina são, portanto, cruciais para a homeostase celular de ferro. A síntese dessas três proteínas é regulada em resposta à disponibilidade de ferro – e a aconitase, em uma de suas funções, desempenha uma função-chave na regulação.

A aconitase tem um agrupamento Fe-S essencial no sítio ativo (ver Figura 16-10). Quando uma célula é exaurida de ferro, esse agrupamento Fe-S é desmantelado e a enzima perde sua atividade como aconitase. Entretanto, a apoenzima (apoaconitase, carecendo do agrupamento Fe-S) assim formada adquire agora sua segunda atividade – a capacidade de ligar-se a sequências específicas nos mRNA do receptor de transferrina e da ferritina, regulando dessa maneira a síntese proteica ao nível da tradução. Duas **proteínas reguladoras de ferro**, **IRP1** e **IRP2** (IRP de *iron regulation protein*), foram descobertas independentemente como reguladoras do metabolismo do ferro. Como provado posteriormente, IRP1 é idêntica à apoaconitase citosólica, e IRP2 é muito semelhante a IRP1 em estrutura e função, porém, ao contrário de IRP1, IRP2 não pode ser convertida à aconitase enzimaticamente ativa. Ambas IRP1 e IRP2 se ligam a regiões nos mRNA que codificam a ferritina e o receptor de transferrina, com consequências sobre a mobilização e a captação de ferro. Essas sequências no mRNA fazem parte de estruturas em grampo (p. 292) chamadas de **elementos de resposta a ferro** (**IRE**, de *iron response elements*), localizadas nas extre-

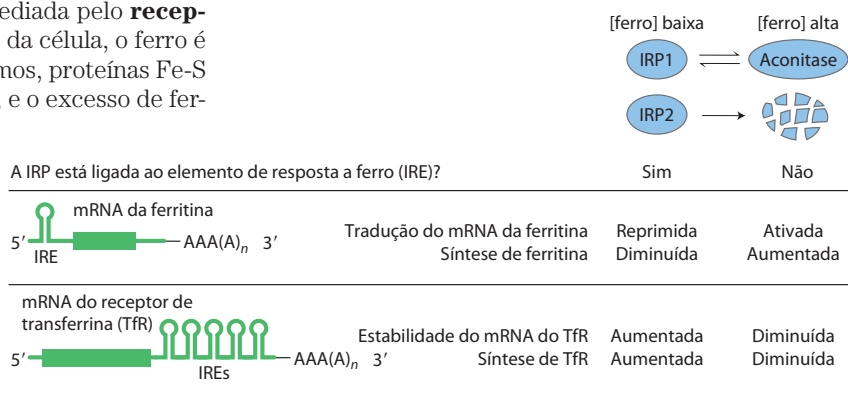
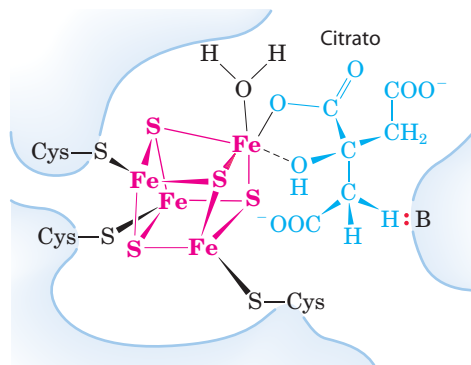



**FIGURA Q-1** O efeito de IRP1 e IRP2 sobre os mRNA da ferritina e do receptor de transferrina.

**FIGURA 16-10 Centro de ferro-enxofre da aconitase.** O centro de ferro-enxofre está em vermelho, e a molécula de citrato está em azul. Três resíduos de Cys da enzima ligam três átomos de ferro; o quarto ferro está ligado a um dos grupos carboxil do citrato e também interage não covalentemente com um grupo hidroxil do citrato (ligação descontínua). Um resíduo básico (:B) na enzima auxilia no posicionamento do citrato no sítio ativo. O centro de ferro-enxofre atua na ligação do substrato e na catálise. As propriedades gerais das proteínas ferro-enxofre estão discutidas no Capítulo 19 (ver Figura 19-5).

midades 3′ e 5′ dos mRNA (Figura Q-1). Quando ligadas à sequência IRE da região 5′ não traduzida do mRNA da ferritina, as IRP bloqueiam a síntese de ferritina; quando ligadas às sequências IRE da região 3′ não traduzida do mRNA do receptor de transferrina, as IRP estabilizam o mRNA, impedindo sua degradação e possibilitando a síntese de mais cópias da proteína receptora por molécula de mRNA. Assim, em células com deficiência de ferro, a captação de ferro torna-se mais eficiente e o armazenamento de ferro (ligado à ferritina) é reduzido. Quando a concentração celular de ferro retorna aos níveis normais, IRP1 é convertida a aconitase, e IRP2 é degradada por proteólise, encerrando a resposta aos baixos níveis de ferro.

A aconitase enzimaticamente ativa e a apoaconitase com atividade reguladora (na segunda jornada da proteína) apresentam estruturas diferentes. Como aconitase ativa, a proteína tem dois lóbulos que se fecham ao redor do agrupamento Fe-S; como IRP1, os dois lóbulos se abrem, expondo o sítio de ligação ao mRNA (Figura Q-2).

A aconitase é apenas uma de uma lista crescente de enzimas conhecidas (ou presumidas) por realizarem uma segunda função. Muitas das enzimas glicolíticas estão incluídas nesse grupo. A piruvato-cinase atua no núcleo para regular a transcrição de genes responsivos ao hormônio da tireoide. A gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase atua tanto como uracila-DNA-glicosilase, afetando o reparo de DNA danificado, quanto como regulador da transcrição da histona H2B. O cristalino dos olhos dos vertebrados apresenta algumas enzimas glicolíticas multifuncionais, incluindo a fosfoglicerato-cinase, triose-fosfato-isomerase e lactato-desidrogenase.

Até recentemente, a descoberta de que uma proteína tem mais de uma função era principalmente uma questão de sorte: dois grupos de pesquisadores estudando duas questões não relacionadas descobriam que "suas" proteínas tinham propriedades similares, as comparavam cuidadosamente e descobriam que elas eram idênticas. Com o crescimento das bases de dados com sequências de DNA e de proteínas anotadas, os pesquisadores agora podem investigar deliberadamente a multifuncionalidade das proteínas, procurando nas bases de dados por qualquer outra proteína com a mesma sequência que a proteína sob estudo, porém com função diferente. Isso também significa que uma proteína anotada nas bases de dados como exercendo uma determinada função não necessariamente tenha *apenas* aquela função. O conhecimento de proteínas com mais de uma função também pode explicar alguns resultados intrigantes: experimentos nos quais uma proteína com uma função conhecida é inativada por uma mutação, mas os organismos mutantes resultantes apresentam um fenótipo sem uma relação óbvia com aquela função.

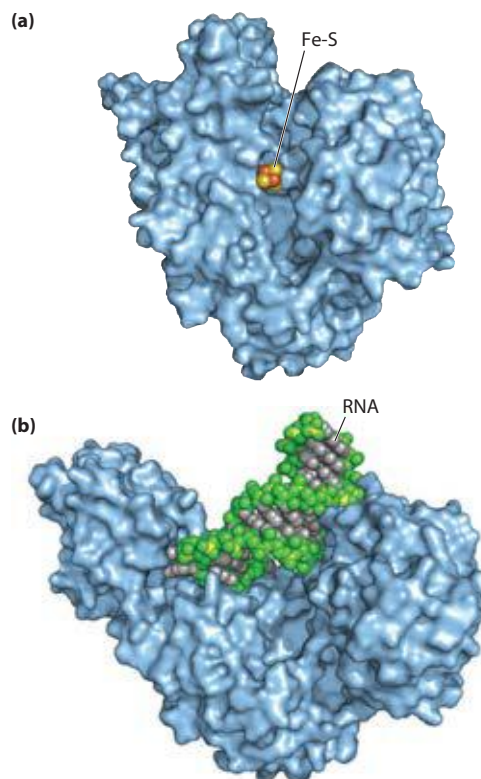



**FIGURA Q-2** As duas formas da aconitase/IRP1 citosólica com duas funções distintas. **(a)** Na aconitase, os dois lóbulos principais estão fechados e o agrupamento Fe-S está completamente coberto; a proteína está representada de forma transparente para exibir o agrupamento Fe-S (PDB ID 2B3Y). **(b)** Na IRP1, os lóbulos se abrem, expondo um sítio de ligação à estrutura em grampo do mRNA do substrato (PDB ID 2IPY).

Isocitrato — $NAD(P)^+$ → $NAD(P)H + H^+$ (Isocitrato-desidrogenase) → Oxalosuccinato → $CO_2$ → [intermediário enol, $Mn^{2+}$] → α-Cetoglutarato

**1** O isocitrato é oxidado pela transferência do hidreto ao $NAD^+$ ou $NADP^+$ (dependendo da isoenzima da isocitrato-desidrogenase).

**2** A descarboxilação é facilitada pela remoção dos elétrons pelo carbonil adjacente e pelo $Mn^{2+}$ coordenado.

**3** O rearranjo do intermediário enol gera α-cetoglutarato.

**MECANISMO-FIGURA 16-11 Isocitrato-desidrogenase.** Nesta reação, o substrato, isocitrato, perde um carbono por descarboxilação oxidativa. Ver Figura 14-14 para mais informações sobre reações de transferência de hidretos envolvendo $NAD^+$ e $NADP^+$.

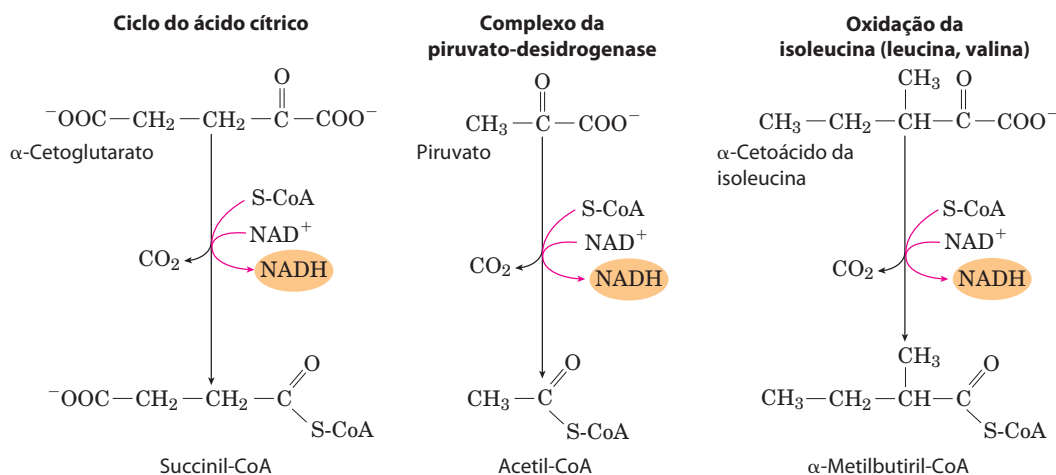



**FIGURA 16-12 Um mecanismo conservado para a descarboxilação oxidativa.** As rotas mostradas empregam os mesmos cinco cofatores (pirofosfato de tiamina, coenzima A, lipoato, FAD e $NAD^+$), complexos multienzimáticos muito parecidos, e o mesmo mecanismo enzimático para efetuar a descarboxilação do piruvato (pelo complexo da piruvato-desidrogenase), do $\alpha$-cetoglutarato (no ciclo do ácido cítrico), e do esqueleto de carbono dos três aminoácidos ramificados, isoleucina (mostrado aqui), leucina e valina. Uma quarta reação, catalisada pela glicina-descarboxilase, envolve um mecanismo muito semelhante (ver Figura 20-22).

com o grupo carbonil do oxalosuccinato intermediário, que é formado transitoriamente, mas só deixa o sítio ativo quando a descarboxilação o converte em $\alpha$-cetoglutarato. O $Mn^{2+}$ também estabiliza o enol formado transitoriamente por descarboxilação.

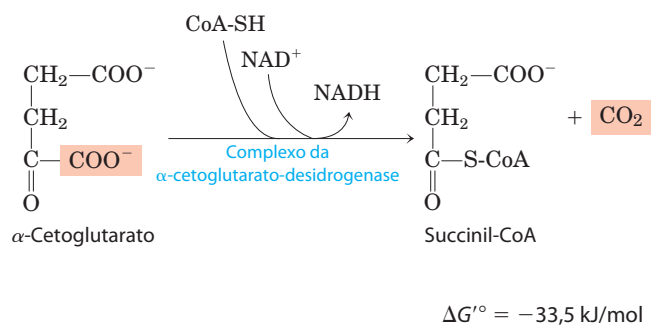
Em todas as células, existem duas formas diferentes de isocitrato-desidrogenase, uma que exige $NAD^+$ como aceptor de elétrons e outra que exige $NADP^+$. As reações gerais são, em outros aspectos, idênticas. Em células eucarióticas, a enzima dependente de NAD encontra-se na matriz mitocondrial e participa do ciclo do ácido cítrico. A principal função da enzima dependente de NADP, encontrada na matriz mitocondrial e no citosol, possivelmente seja a produção de NADPH, essencial para as reações redutoras anabólicas.

**❹ Oxidação do $\alpha$-cetoglutarato a succinil-CoA e $CO_2$.** A etapa seguinte é outra descarboxilação oxidativa, na qual o $\alpha$-cetoglutarato é convertido a **succinil-CoA** e $CO_2$ pela ação do **complexo da $\alpha$-cetoglutarato-desidrogenase**; $NAD^+$ é o aceptor de elétrons e CoA é o transportador do grupo succinil. A energia da oxidação do $\alpha$-cetoglutarato é conservada pela formação da ligação tioéster da succinil-CoA:

CoA-SH, $NAD^+$ → NADH

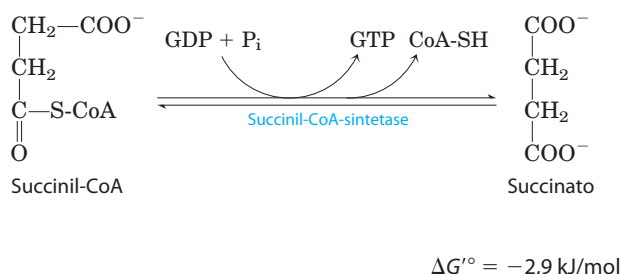
$CH_2$—$COO^-$ / $CH_2$ / C—$COO^-$ (=O) → (Complexo da $\alpha$-cetoglutarato-desidrogenase) → $CH_2$—$COO^-$ / $CH_2$ / C—S-CoA (=O) + $CO_2$

$\alpha$-Cetoglutarato — Succinil-CoA

$\Delta G'^\circ = -33{,}5$ kJ/mol

Essa reação é essencialmente idêntica à reação da piruvato-desidrogenase discutida anteriormente, e à sequência de reações responsável pela degradação dos aminoácidos com cadeia ramificada (**Figura 16-12**). O complexo $\alpha$-cetoglutarato-desidrogenase é bastante semelhante ao complexo da PDH em estrutura e função. O complexo $\alpha$-cetoglutarato-desidrogenase incorpora três enzimas homólogas às $E_1$, $E_2$ e $E_3$ do complexo da PDH, e também contém TPP e lipoato ligado à enzima, FAD, NAD e coenzima A. Ambos os complexos são certamente derivados de um ancestral evolutivo comum. Embora os componentes $E_1$ dos dois complexos sejam estruturalmente similares, suas sequências de aminoácidos diferem e, naturalmente, eles apresentam especificidades de ligação diferentes: $E_1$ do complexo da PDH liga-se ao piruvato, e $E_1$ do complexo da $\alpha$-cetoglutarato-desidrogenase liga-se ao $\alpha$-cetoglutarato. Os componentes $E_2$ dos dois complexos também são muito similares, ambos contendo lipoil ligado covalentemente. As subunidades $E_3$ são idênticas nos dois complexos enzimáticos. O complexo que degrada $\alpha$-cetoácidos com cadeias ramificadas (ver Figura 18-28) catalisa a mesma sequência de reações utilizando os mesmos cinco cofatores. Esse é um exemplo claro de **evolução divergente**, na qual os genes que codificam para uma enzima com uma especificidade de substrato originam, durante a evolução, enzimas proximamente relacionadas com especificidades de substrato diferentes, mas com o mesmo mecanismo enzimático.

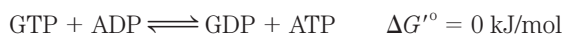
**❺ Conversão de succinil-CoA a succinato.** A succinil-CoA, como a acetil-CoA, tem uma ligação tioéster com uma energia livre padrão de hidrólise grande e negativa ($\Delta G'^\circ \approx -36$ kJ/mol). Na próxima etapa do ciclo do ácido cítrico, a energia liberada pelo rompimento dessa ligação é utilizada para impelir a síntese de uma ligação fosfoanidrido no GTP ou ATP, com um $\Delta G'^\circ$ de apenas $-2{,}9$ kJ/mol. O **succinato** é formado neste processo:

$$\underset{\text{Succinil-CoA}}{\overset{}{CH_2{-}COO^-\;|\;CH_2\;|\;C({=}O){-}S\text{-}CoA}} \quad \xrightleftharpoons[\text{Succinil-CoA-sintetase}]{GDP\,+\,P_i \;\;\to\;\; GTP\;\; CoA\text{-}SH} \quad \underset{\text{Succinato}}{COO^-\;|\;CH_2\;|\;CH_2\;|\;COO^-}$$

$$\Delta G'^{\circ} = -2{,}9\ \text{kJ/mol}$$

A enzima que catalisa essa reação reversível é chamada de **succinil-CoA-sintetase** ou **succinato-tiocinase**; ambos os nomes indicam a participação de um nucleosídeo trifosfatado na reação (Quadro 16-2).

Essa reação que poupa energia envolve uma etapa intermediária, na qual a própria molécula da enzima é fosforilada em um resíduo de His no sítio ativo (**Figura 16-13a**). Esse grupo fosfato, que tem alto potencial de transferência de grupo, é transferido ao ADP (ou GDP) para a formação de ATP (ou GTP). As células animais têm duas isoenzimas da succinil-CoA-sintetase, uma específica para ADP e outra para GDP. A enzima contém duas subunidades, $\alpha$ ($M_r$ 32.000), que tem o resíduo de Ⓟ-His ($His^{246}$) e o sítio de ligação para CoA, e $\beta$ ($M_r$ 42.000), que confere a especificidade por ADP ou GDP. O sítio ativo se situa na interface entre as subunidades. A estrutura do cristal da succinil-CoA-sintetase revela duas "hélices elétricas" (uma em cada subunidade), orientadas de maneira que seus dipolos elétricos posicionem as cargas parciais positivas próximas ao resíduo His-Ⓟ carregado negativamente (Figura 16-13b), estabilizando o intermediário fosfoenzima. (Relembre a função similar das hélices bipolares na estabilização dos íons $K^+$ no canal de $K^+$; ver Figura 11-47.)

A formação de ATP (ou GTP) à custa da energia liberada pela descarboxilação oxidativa do $\alpha$-cetoglutarato é uma fosforilação ao nível do substrato, como a síntese de ATP nas reações glicolíticas catalisadas por gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase e piruvato-cinase (ver Figura 14-2). O GTP formado pela succinil-CoA-sintetase pode doar o grupo fosfato terminal ao ADP para formar ATP, em uma reação reversível catalisada pela **nucleosídeo-difosfato-cinase** (p. 526):

$$GTP + ADP \rightleftharpoons GDP + ATP \qquad \Delta G'^{\circ} = 0\ \text{kJ/mol}$$

Desse modo, o resultado líquido da atividade de cada isoenzima da succinil-CoA-sintetase é a conservação de energia como ATP. Não há variação de energia livre na reação da nucleosídeo-difosfato-cinase; ATP e GTP são energeticamente equivalentes.

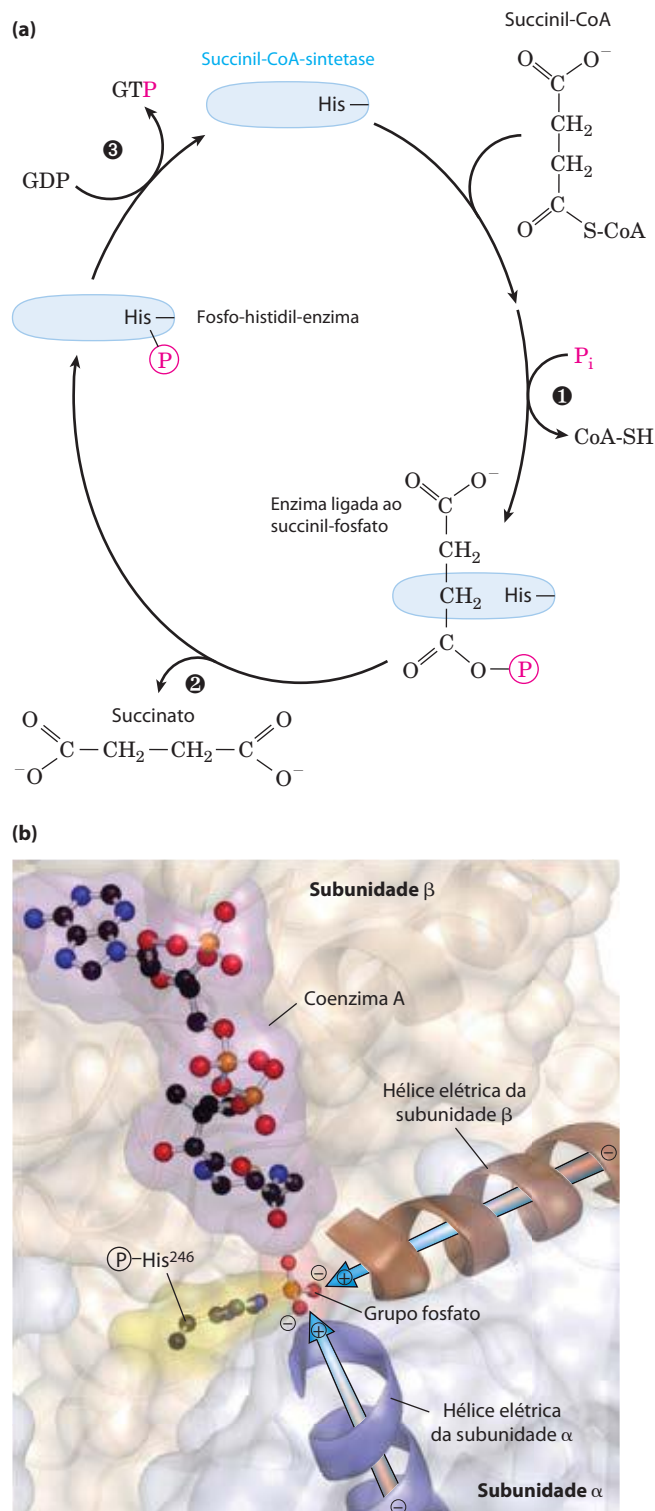



**FIGURA 16-13 A reação da succinil-CoA-sintetase. (a)** Na etapa ❶, a CoA da succinil-CoA ligada à enzima é substituída por um grupo fosfato, formando um acil-fosfato de alta energia. Na etapa ❷, o succinil-fosfato doa o grupo fosfato para um resíduo de His da enzima, originando uma fosfo-histidil-enzima de alta energia. Na etapa ❸, o grupo fosfato é transferido do resíduo de His ao fosfato terminal do GDP (ou ADP), formando GTP (ou ATP). **(b)** Sítio ativo da succinil-CoA-sintetase de *E. coli* (derivado da estrutura de PDB ID 1SCU). O sítio ativo inclui parte de ambas as subunidades, $\alpha$ (em azul) e $\beta$ (em marrom). As hélices carregadas (azul, marrom) posicionam as cargas parciais positivas do dipolo da hélice próximas ao grupo fosfato de Ⓟ-$His^{246}$ na cadeia $\alpha$, estabilizando a enzima com a fosfo-histidina. As enzimas de mamíferos e bactérias apresentam sequências de aminoácidos e estruturas tridimensionais similares.

## QUADRO 16-2 Sintases e sintetases; ligases e liases; cinases, fosfatases e fosforilases: sim, os nomes são confusos!

A citrato-sintase é uma das muitas enzimas que catalisam reações de condensação, que geram um produto quimicamente mais complexo do que os precursores. **Sintases** catalisam reações de condensação nas quais nenhum nucleosídeo trifosfatado (ATP, GTP e assim por diante) é necessário como fonte de energia. **Sintetases** catalisam reações de condensação que *de fato* utilizam ATP ou outro nucleosídeo trifosfatado como uma fonte de energia para a reação sintética. A succinil-CoA-sintetase é uma destas enzimas. **Ligases** (do latim *ligare*, "amarrar") são enzimas que catalisam reações de condensação nas quais dois átomos são unidos, utilizando ATP ou outra fonte de energia. (Portanto, sintetases são ligases.) A DNA-ligase, por exemplo, conserta quebras em moléculas de DNA, utilizando energia suprida por ATP ou $NAD^+$; essa enzima é largamente utilizada na engenharia genética para unir pedaços de DNA. Ligases não devem ser confundidas com **liases**, enzimas que catalisam clivagens (ou, na reação inversa, adições), nas quais ocorrem rearranjos eletrônicos. O complexo da PDH, que remove o $CO_2$ da molécula de piruvato em uma reação de oxidação, é um membro da ampla classe das liases.

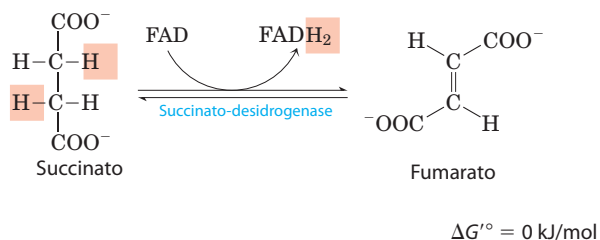
O nome **cinase** é aplicado a enzimas que transferem um grupo fosfato de um nucleosídeo trifosfatado, como o ATP, para uma molécula aceptora – um açúcar (como a hexocinase e a glicocinase), uma proteína (como a glicogênio-fosforilase-cinase), outro nucleotídeo (como a nucleosídeo-difosfato-cinase) ou um intermediário metabólico, como o oxaloacetato (como a PEP-carboxicinase). A reação catalisada por uma cinase é uma *fosforilação*. Por outro lado, a *fosforólise* é uma reação de substituição, na qual o fosfato inorgânico ataca uma ligação química e é covalentemente ligado à molécula no ponto de quebra da ligação. Tais reações são catalisadas por **fosforilases**. A glicogênio-fosforilase, por exemplo, catalisa a fosforólise do glicogênio, produzindo glicose-1-fosfato. A *desfosforilação*, remoção de um grupo fosfato a partir de um éster de fosfato, é catalisada por **fosfatases**, que utilizam a água como espécie atacante. A frutose-bifosfatase-1 converte frutose-1,6-bifosfato a frutose-6-fosfato na gliconeogênese, e a fosforilase-α-fosfatase retira os grupos fosfato dos resíduos de fosfosserina na glicogênio-fosforilase fosforilada. Ufa!

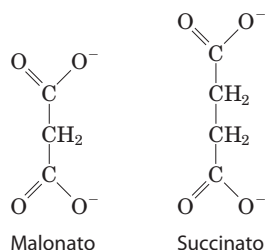
Infelizmente, essas descrições dos tipos de enzimas se sobrepõem, e muitas enzimas são comumente chamadas por dois ou mais nomes. A succinil-CoA-sintetase, por exemplo, também é chamada de succinato-tiocinase; a enzima é uma sintetase no ciclo do ácido cítrico e uma cinase quando age no sentido da síntese de succinil-CoA. Isso expõe outra fonte de confusão na nomenclatura de enzimas. Uma enzima pode ter sido descoberta com a utilização de um experimento no qual, por exemplo, A é convertido em B. A enzima é, então, chamada de acordo com essa reação. Trabalhos posteriores, entretanto, podem mostrar que, na célula, a enzima funciona principalmente convertendo B a A. Geralmente, o primeiro nome continua a ser utilizado, embora a função metabólica da enzima fosse mais bem descrita nomeando-a pela reação inversa. A enzima glicolítica piruvato-cinase ilustra esta situação (p. 554). Para um principiante na bioquímica, essa duplicação da nomenclatura pode ser desorientadora. Comissões internacionais têm feito esforços heroicos para sistematizar a nomenclatura das enzimas (ver Tabela 6-3 para um breve resumo do sistema), porém alguns nomes sistemáticos são muito longos e complicados e não são utilizados no dia a dia bioquímico.

Ao longo deste livro, tentou-se utilizar os nomes enzimáticos mais comumente utilizados pelos bioquímicos e chamar a atenção para os casos nos quais uma enzima tem mais de um nome amplamente utilizado. Para informações atualizadas sobre a nomenclatura enzimática, recorra às recomendações da Comissão de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology; www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/nomenclature/).

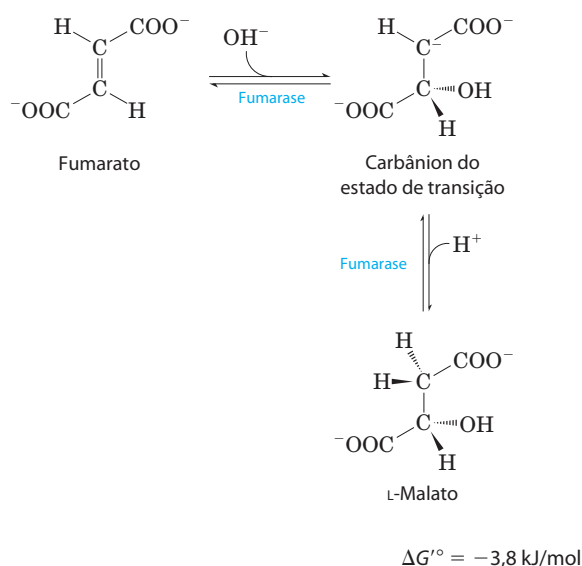
**❻ Oxidação do succinato a fumarato.** O succinato formado a partir da succinil-CoA é oxidado a **fumarato** pela flavoproteína **succinato-desidrogenase**:

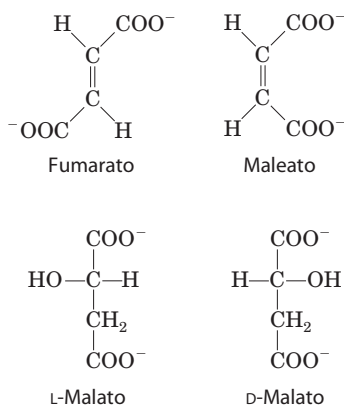
Succinato ($^-OOC-CH_2-CH_2-COO^-$) + FAD ⇌ (Succinato-desidrogenase) Fumarato ($^-OOC-CH=CH-COO^-$) + $FADH_2$

$\Delta G'^\circ = 0$ kJ/mol

Em eucariotos, a succinato-desidrogenase está firmemente ligada à membrana mitocondrial interna; em bactérias, está ligada à membrana plasmática. A enzima contém três grupos ferro-enxofre diferentes e uma molécula de FAD covalentemente ligada (ver Figura 19-10). Os elétrons do succinato passam pelo FAD e pelos centros de ferro-enxofre antes de entrarem na cadeia de transportadores de elétrons da membrana mitocondrial interna (da membrana plasmática em bactérias). O fluxo dos elétrons do succinato ao longo desses transportadores até o aceptor de elétrons final, $O_2$, é acoplado à síntese de aproximadamente 1,5 molécula de ATP por par de elétrons (fosforilação acoplada à respiração). Malonato, análogo do succinato normalmente ausente nas células, é um forte inibidor competitivo da succinato-desidrogenase, e sua adição à mitocôndria bloqueia a atividade do ciclo do ácido cítrico.

Malonato Succinato

❼ **Hidratação do fumarato a malato.** A hidratação reversível do fumarato a **L-malato** é catalisada pela **fumarase** (formalmente, **fumarato-hidratase**). O estado de transição dessa reação é um carbânion:

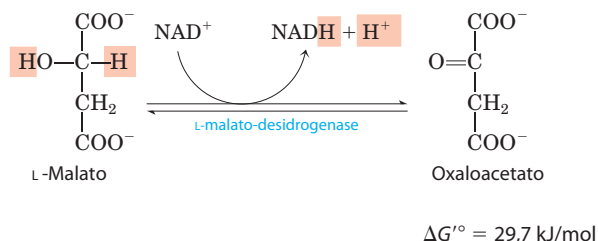
Fumarato
Fumarase
Carbânion do estado de transição
Fumarase
L-Malato

$\Delta G'^{\circ} = -3{,}8$ kJ/mol

Essa enzima é altamente estereoespecífica; ela catalisa a hidratação da ligação dupla *trans* do fumarato, mas não a da ligação dupla *cis* do maleato (o isômero *cis* do fumarato). Na direção inversa (de L-malato para fumarato), a fumarase é igualmente estereoespecífica: D-malato não é um substrato.

Fumarato Maleato

L-Malato D-Malato

❽ **Oxidação do malato a oxaloacetato.** Na última reação do ciclo do ácido cítrico, a **L-malato-desidrogenase** ligada ao NAD catalisa a oxidação de L-malato a oxaloacetato:

L-Malato
$NAD^+$ → $NADH + H^+$
L-malato-desidrogenase
Oxaloacetato

$\Delta G'^{\circ} = 29{,}7$ kJ/mol

O equilíbrio dessa reação é muito deslocado para a esquerda sob as condições termodinâmicas padrão, porém, nas células intactas, o oxaloacetato é continuamente removido pela reação altamente exergônica da citrato-sintase (etapa ❷ da Figura 16-7). Isso mantém a concentração celular de oxaloacetato extremamente baixa ($< 10^{-6}$M), deslocando a reação da malato-desidrogenase no sentido da formação de oxaloacetato.

Embora as reações individuais do ciclo do ácido cítrico tenham sido inicialmente elucidadas *in vitro*, utilizando tecido muscular macerado, a via e sua regulação também têm sido intensamente estudadas *in vivo*. Com a utilização de precursores marcados radioativamente, como [$^{14}$C]piruvato e [$^{14}$C]acetato, os pesquisadores têm delineado o destino de átomos de carbono individuais durante o ciclo do ácido cítrico. Alguns dos experimentos iniciais com isótopos, entretanto, produziram resultados inesperados, que originaram considerável controvérsia sobre a via e o mecanismo do ciclo do ácido cítrico. Na verdade, esses experimentos pareciam inicialmente mostrar que o citrato não era o primeiro ácido tricarboxílico formado. O Quadro 16-3 conta alguns detalhes desse episódio da história da pesquisa do ciclo do ácido cítrico. O fluxo metabólico ao longo do ciclo agora pode ser monitorado em tecidos vivos com o uso de precursores marcados com $^{13}$C e espectroscopia por RMN. Como o sinal de RMN é exclusivo do composto contendo $^{13}$C, os bioquímicos podem determinar o movimento dos carbonos dos precursores em cada intermediário do ciclo e em compostos derivados destes intermediários. Essa técnica é bastante promissora para os estudos da regulação do ciclo do ácido cítrico e suas interconexões com outras vias metabólicas, como a glicólise.

## A energia das oxidações do ciclo é conservada de maneira eficiente

Até aqui foi esmiuçada uma rodada completa do ciclo do ácido cítrico (**Figura 16-14**). Um grupo acetil com dois carbonos entra no ciclo combinando-se com o oxaloacetato. Dois átomos de carbono saem do ciclo na forma de $CO_2$ pela oxidação do isocitrato e do $\alpha$-cetoglutarato. A energia liberada por estas oxidações foi conservada pela redução de três $NAD^+$ e um FAD e pela produção de um ATP ou GTP. No final do ciclo, uma molécula de oxaloacetato foi regenerada. Lembre que os dois átomos de carbono que emergem como $CO_2$ não são os mesmos dois carbonos que entraram na forma de grupo acetil; rodadas adicionais são necessárias para que estes carbonos sejam liberados na forma de $CO_2$ (Figura 16-7).

## QUADRO 16-3 Citrato: molécula simétrica que reage assimetricamente

Quando os compostos enriquecidos no isótopo de carbono pesado $^{13}C$ e nos isótopos de carbono radioativos $^{11}C$ e $^{14}C$ se tornaram disponíveis cerca de 60 anos atrás, eles foram imediatamente utilizados para definir o rumo dos átomos de carbono durante o ciclo do ácido cítrico. Um desses experimentos desencadeou a controvérsia sobre a função do citrato. Acetato marcado no grupo carboxil (designado [1-$^{14}C$]acetato) foi incubado sob condições aeróbias com uma preparação de tecido animal. O acetato é enzimaticamente convertido a acetil-CoA nos tecidos animais, e a via do carbono do carboxil marcado, agora presente no grupo acetil, poderia assim ser determinada durante o ciclo de reações. $\alpha$-Cetoglutarato foi isolado do tecido após a incubação, sendo então degradado quimicamente por meio de reações químicas conhecidas para estabelecer a(s) posição(ões) do carbono isotópico.

Esperava-se que a condensação de oxaloacetato não marcado com acetato marcado no carboxil produzisse citrato marcado em um dos dois grupos carboxil primários. O citrato é uma molécula simétrica, seus dois grupos carboxil terminais são indistinguíveis. Consequentemente, era esperado que metade das moléculas de citrato marcadas originasse $\alpha$-cetoglutarato marcado no grupo carboxil $\alpha$ e que a outra metade originasse $\alpha$-cetoglutarato marcado no grupo carboxil $\gamma$: isto é, esperava-se que o $\alpha$-cetoglutarato isolado fosse uma mistura dos dois tipos de moléculas marcadas (Figura Q-1, vias ❶ e ❷). Contrariando essas expectativas, o $\alpha$-cetoglutarato marcado isolado da suspensão de tecido continha $^{14}C$ somente no grupo carboxil $\gamma$ (Figura Q-1, via ❶). Os investigadores concluíram que o citrato (ou qualquer outra molécula simétrica) não poderia ser um intermediário da via entre acetato e $\alpha$-cetoglutarato. Em vez disso, um ácido tricarboxílico assimétrico, presumivelmente *cis*-aconitato ou isocitrato, deveria ser o primeiro produto formado pela condensação de acetato e oxaloacetato.

Em 1948, entretanto, Alexandre Ogston mostrou que, embora o citrato não tenha centro quiral (ver Figura 1-20), ele tem *potencial* para reagir assimetricamente se a enzima com a qual ele interage possuir um sítio ativo assimétrico. Ele sugeriu que o sítio ativo da aconitase tinha três pontos aos quais o citrato deveria estar ligado e que o citrato deveria posicionar-se de maneira a se unir especificamente a esses três pontos. Como visto na Figura Q-2, a ligação do citrato aos três pontos poderia ocorrer de uma maneira apenas, e isso acarretaria na formação de um único tipo de $\alpha$-cetoglutarato marcado. Moléculas orgânicas como o citrato, sem centro quiral, mas potencialmente capazes de reagirem assimetricamente com um sítio ativo assimétrico, são atualmente chamadas de **moléculas pró-quirais**.

Acetato marcado

Oxaloacetato

Citrato marcado

Isocitrato

Apenas este produto foi formado.

Esta segunda forma de $\alpha$-cetoglutarato marcado também era esperada, mas não foi formada.

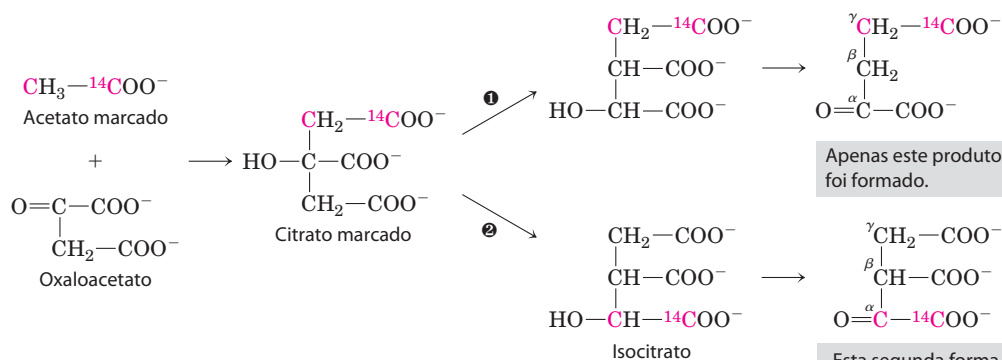



**FIGURA Q-1** Incorporação do carbono isotópico ($^{14}C$) do grupo acetil marcado ao $\alpha$-cetoglutarato durante o ciclo do ácido cítrico. Os átomos de carbono do grupo acetil reagente estão representados em vermelho.

Ligação suscetível

(a) (b) (c)

Esta ligação não pode ser posicionada corretamente e não é atacada.

Esta ligação pode ser posicionada corretamente e é atacada.

O sítio ativo tem pontos de ligação complementares.

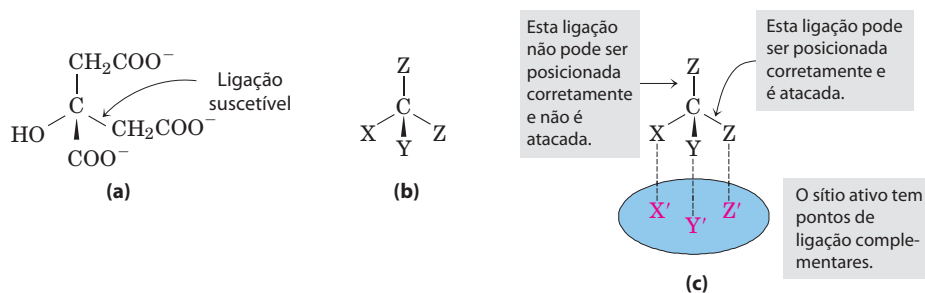



**FIGURA Q-2** A natureza pró-quiral do citrato. **(a)** Estrutura do citrato; **(b)** representação esquemática do citrato: X = —OH; Y = —$COO^-$; Z = —$CH_2COO^-$. **(c)** Encaixe complementar correto do citrato ao sítio de ligação da aconitase. Existe apenas uma maneira na qual os três grupos especificados do citrato podem encaixar-se aos três pontos do sítio de ligação. Portanto, apenas um dos dois grupos —$CH_2COO^-$ liga-se à aconitase.

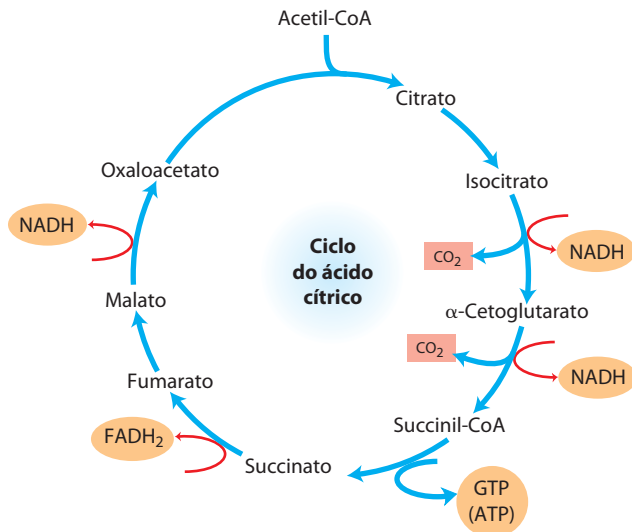



**FIGURA 16-14 Produtos de uma rodada do ciclo do ácido cítrico** A cada rodada do ciclo do ácido cítrico, três moléculas de NADH, uma de $FADH_2$, uma de GTP (ATP) e duas de $CO_2$ são liberadas em reações de descarboxilação oxidativa. Aqui, e em algumas das figuras seguintes, todas as reações do ciclo estão representadas como se elas ocorressem em apenas uma direção, lembre-se, entretanto, que a maioria das reações são reversíveis (ver Figura 16-7).

Embora o ciclo do ácido cítrico gere diretamente somente um ATP por rodada (na conversão de succinil-CoA a succinato), as quatro etapas de oxidação do ciclo abastecem a cadeia respiratória, via NADH e $FADH_2$, com um grande fluxo de elétrons e, assim, levam à formação de um grande número de moléculas de ATP durante a forforilação oxidativa.

Foi visto no Capítulo 14 que o rendimento energético da produção de duas moléculas de piruvato a partir de uma molécula de glicose é de 2 ATP e 2 NADH. Na fosforilação oxidativa (Capítulo 19), a passagem de dois elétrons do NADH ao $O_2$ impele a formação de aproximadamente 2,5 ATP, e a passagem de dois elétrons do $FADH_2$ ao $O_2$ rende cerca de 1,5 ATP. Essa estequiometria nos permite calcular o rendimento global em ATP da oxidação completa da glicose. Quando ambas as moléculas de piruvato são oxidadas a 6 $CO_2$ via complexo da piruvato-desidrogenase e ciclo do ácido cítrico, e os elétrons são transferidos ao $O_2$ via fosforilação oxidativa, 32 ATPs são obtidos por molécula de glicose (Tabela 16-1). Em números redondos, isto representa a conservação de $32 \times 30{,}5$ kJ/mol = 976 kJ/mol, ou 34% do máximo teórico de cerca de 2.840 kJ/mol disponibilizados pela oxidação completa da glicose. Esses cálculos utilizam as variações de energia livre padrão; quando corrigidos para a energia livre de fato requerida para a formação de ATP dentro das células (ver Problema Resolvido 13-2, p. 519), a eficiência calculada do processo aproxima-se de 65%.

## Por que a oxidação do citrato é tão complicada?

Um processo cíclico em oito etapas para a oxidação de simples grupos acetil de dois carbonos a $CO_2$ pode parecer desnecessariamente complicado e em discordância com o princípio biológico de economia máxima. A função do ciclo do ácido cítrico, entretanto, não se restringe à oxidação do acetato. Essa via é o pivô do metabolismo intermediário. Produtos finais com quatro e cinco carbonos originários de muitos processos catabólicos são utilizados para alimentarem o ciclo e servirem como combustíveis. Oxaloacetato e $\alpha$-cetoglutarato, por exemplo, são produzidos a partir de aspartato e glutamato, respectivamente, quando proteínas

**TABELA 16-1** Estequiometria da redução de coenzimas e formação de ATP na oxidação aeróbia da glicose via glicólise, reação do complexo da piruvato-desidrogenase, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa

| Reação | Número de ATP ou coenzimas reduzidas diretamente formados | Número de ATP formados no final do processo* |
|---|---|---|
| Glicose ⟶ glicose-6-fosfato | –1 ATP | –1 |
| Frutose-6-fosfato ⟶ frutose-1,6-bifosfato | –1 ATP | –1 |
| 2 Gliceraldeído-3-fosfato ⟶ 2 1,3-bifosfoglicerato | 2 NADH | 3 ou 5† |
| 2 1,3-Bifosfoglicerato ⟶ 2 3-fosfoglicerato | 2 ATP | 2 |
| 2 Fosfoenolpiruvato ⟶ 2 piruvato | 2 ATP | 2 |
| 2 Piruvato ⟶ 2 acetil-CoA | 2 NADH | 5 |
| 2 Isocitrato ⟶ 2 $\alpha$-cetoglutarato | 2 NADH | 5 |
| 2 $\alpha$-Cetoglutarato ⟶ 2 succinil-CoA | 2 NADH | 5 |
| 2 Succinil-CoA ⟶ 2 succinato | A ATP (ou 2 GTP) | 2 |
| 2 Succinato ⟶ 2 fumarato | 2 $FADH_2$ | 3 |
| 2 Malato ⟶ 2 oxaloacetato | 2 NADH | 5 |
| Total | | 30-32 |

* Calculado como 2,5 ATP por NADH e 1,5 ATP por $FADH_2$. Um valor negativo indica consumo.
† O número formado é 3 ou 5, dependendo do mecanismo utilizado para a transferência de equivalentes de NADH do citosol para a matriz mitocondrial; ver Figuras 19-30 e 19-31.

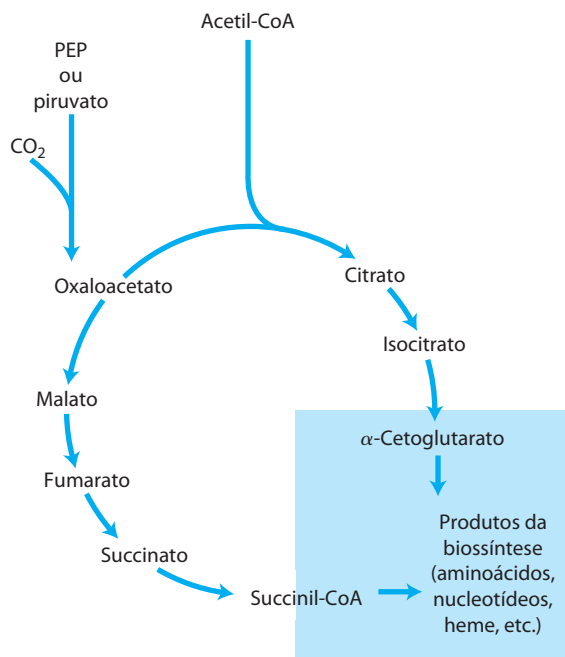



**FIGURA 16-15 Precursores biossintéticos produzidos por um ciclo do ácido cítrico incompleto em bactérias anaeróbias.** Estes organismos anaeróbios carecem de $\alpha$-cetoglutarato-desidrogenase e, portanto, não podem efetuar o ciclo do ácido cítrico completo. $\alpha$-Cetoglutarato e succinil-CoA são precursores em diversas vias biossintéticas. (Ver Figura 16-14 para o sentido "normal" destas reações no ciclo do ácido cítrico.)

são degradadas. Sob determinadas circunstâncias metabólicas, intermediários são drenados do ciclo para serem utilizados como precursores em diferentes vias biossintéticas.

O ciclo do ácido cítrico, como todas as outras vias metabólicas, é um produto da evolução, e essa evolução ocorreu em grande parte antes do surgimento dos organismos aeróbios. Ele não necessariamente representa a via *mais curta* entre acetato e $CO_2$, mas é a via que, ao longo do tempo, tem conferido a maior vantagem seletiva. Anaeróbios primitivos muito provavelmente utilizavam algumas das reações do ciclo do ácido cítrico em processos biossintéticos lineares. Na verdade, alguns microrganismos atuais utilizam um ciclo do ácido cítrico incompleto não como fonte de energia, mas de precursores biossintéticos (**Figura 16-15**). Esses organismos utilizam as três primeiras reações do ciclo para sintetizarem $\alpha$-cetoglutarato, porém, como carecem de $\alpha$-cetoglutarato-desidrogenase, não podem realizar o conjunto completo das reações do ciclo do ácido cítrico. O que esses organismos de fato possuem são as quatro enzimas que catalisam a conversão reversível de oxaloacetato a succinil-CoA e podem produzir malato, fumarato, succinato e succinil-CoA a partir de oxaloacetato, em uma inversão do sentido "normal" (oxidativo) do fluxo do ciclo. Essa via é uma fermentação, e o NADH produzido pela oxidação do isocitrato é reciclado a $NAD^+$ pela redução do oxaloacetato a succinato.

Com a evolução das cianobactérias, que produzem $O_2$ a partir de água, a atmosfera da Terra tornou-se aeróbia e os organismos sofreram uma pressão seletiva para o desenvolvimento do metabolismo aeróbio, o qual é muito mais eficiente do que a fermentação anaeróbia.

## Os componentes do ciclo do ácido cítrico são importantes intermediários da biossíntese

Em organismos aeróbios, o ciclo do ácido cítrico é uma **via anfibólica**, ou seja, que serve a processos catabólicos e anabólicos. Além do papel no catabolismo oxidativo de carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos, o ciclo fornece precursores para muitas vias de biossíntese (**Figura 16-16**), por meio das reações que serviram a esse mesmo propósito em ancestrais anaeróbios. $\alpha$-Cetoglutarato e oxaloacetato podem, por exemplo, ser os precursores dos aminoácidos aspartato e glutamato por simples transaminação (Capítulo 22). Por meio do aspartato e do glutamato, os carbonos do oxaloacetato e $\alpha$-cetoglutarato são, então, utilizados para a síntese de outros aminoácidos, assim como para a síntese de nucleotídeos de purinas e pirimidinas. O oxaloacetato é convertido em glicose na gliconeogênese (ver Figura 15-13). A succinil-CoA é um intermediário central para a síntese do anel porfirínico dos grupos heme, que agem como transportadores de oxigênio (na hemoglobina e na mioglobina) e transportadores de elétrons (nos citocromos) (ver Figura 22-25). E o citrato produzido por alguns organismos é utilizado comercialmente para uma grande variedade de propósitos.

## Reações anapleróticas repõem os intermediários do ciclo do ácido cítrico

Conforme os intermediários do ciclo do ácido cítrico são removidos para servirem como precursores na biossíntese, eles são repostos por **reações anapleróticas** (Figura 16-16; Tabela 16-2). Sob circunstâncias normais, há um equilíbrio dinâmico nas reações que desviam os intermediários a outras vias e os repõem, de modo que as concentrações dos intermediários do ciclo do ácido cítrico permaneçam quase constantes.

A Tabela 16-2 mostra as reações anapleróticas mais comuns, as quais, em vários tecidos e organismos, convertem ou piruvato ou fosfoenolpiruvato a oxaloacetato ou malato. A reação anaplerótica mais importante no fígado e nos rins de mamíferos é a carboxilação reversível do piruvato pelo $CO_2$ para a formação de oxaloacetato, catalisada pela **piruvato-carboxilase**. Quando o ciclo do ácido cítrico está deficiente em oxaloacetato ou qualquer outro intermediário, o piruvato é carboxilado para produzir mais oxaloacetato. A adição enzimática de um grupo carboxil ao piruvato requer energia, que é suprida pelo ATP – a energia livre necessária para unir um grupo carboxil ao piruvato é aproximadamente igual à energia livre disponibilizada pelo ATP.

A piruvato-carboxilase é uma enzima de regulação essencialmente inativa na ausência de acetil-CoA, seu modulador alostérico positivo. Sempre que a acetil-CoA, o combustível do ciclo do ácido cítrico, está presente em excesso, ela estimula a reação da piruvato-carboxilase para a produção de mais oxaloacetato, permitindo que o ciclo utilize mais acetil-CoA na reação da citrato-sintase.

As outras reações anapleróticas mostradas na Tabela 16-2 também são reguladas de modo a manter o nível dos intermediários suficientemente alto para sustentar a ativi-

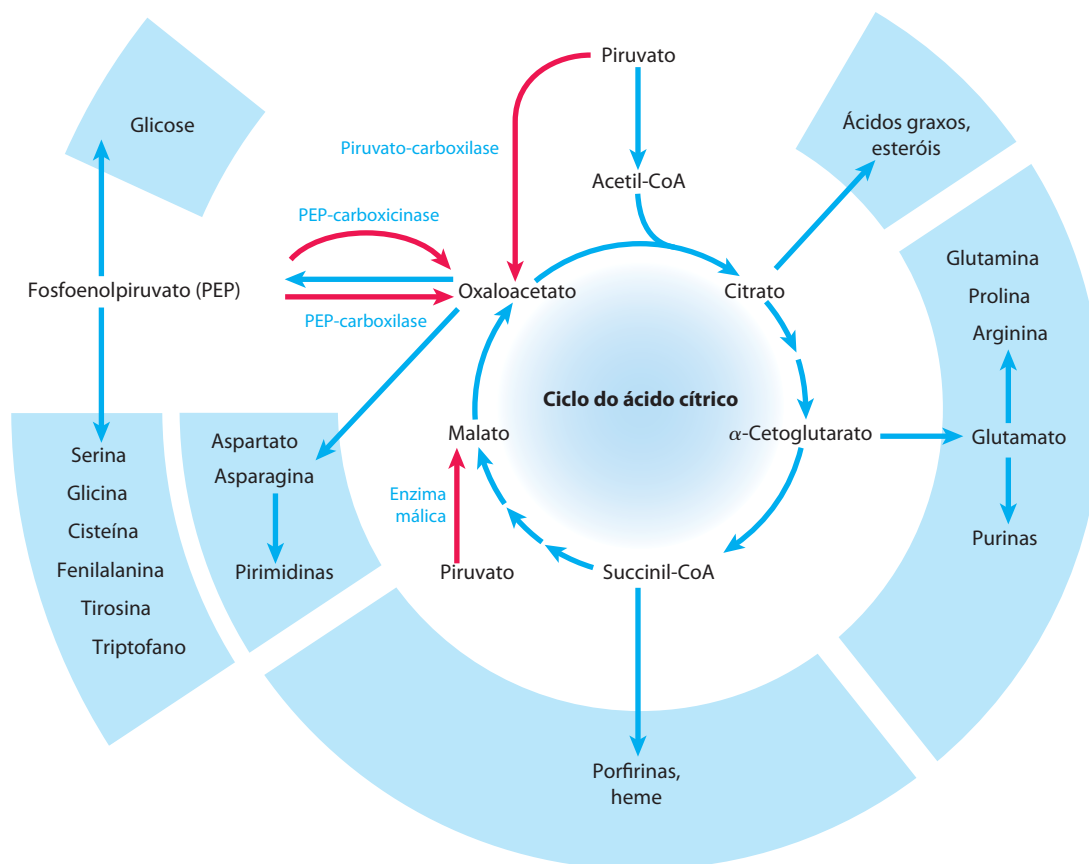



**FIGURA 16-16 Papel do ciclo do ácido cítrico no anabolismo.** Intermediários do ciclo do ácido cítrico são desviados como precursores de muitas vias biossintéticas. Em vermelho aparecem quatro reações anapleróticas que repõem os intermediários do ciclo esgotados (ver Tabela 16-2).

dade do ciclo do ácido cítrico. A fosfoenolpiruvato-carboxilase, por exemplo, é ativada pelo intermediário glicolítico frutose-1,6-bifosfato, que se acumula quando o ciclo do ácido cítrico processa muito lentamente o piruvato gerado pela glicólise.

## A biotina da piruvato-carboxilase transporta grupos $CO_2$

A reação da piruvato-carboxilase requer a vitamina **biotina** (**Figura 16-17**), que é o grupo prostético da enzima. A biotina tem uma função-chave em muitas reações de carboxilação. Ela é um transportador especializado dos grupos de um carbono em sua forma mais oxidada: $CO_2$. (A transferência de grupos de um carbono em formas mais reduzidas é mediada por outros cofatores, particularmente tetra-hidrofolato e *S*-adenosilmetionina, como descrito no Capítulo 18.) Os grupos carboxil são ativados em uma reação que une o $CO_2$ à biotina ligada à enzima com consumo de ATP. Esse $CO_2$ "ativado" passa a um aceptor (piruvato, nesse caso) em uma reação de carboxilação.

A piruvato-carboxilase tem quatro subunidades idênticas, cada uma contendo uma molécula de biotina ligada covalentemente por uma ligação amida com o grupo amino $\varepsilon$ de um resíduo de Lys específico presente no sítio ativo da enzima. A carboxilação do piruvato ocorre em duas etapas

**TABELA 16-2** Reações anapleróticas

| Reação | Tecido(s)/organismo(s) |
|---|---|
| Piruvato + $HCO_3^-$ + ATP $\xrightleftharpoons{\text{Piruvato-carboxilase}}$ oxaloacetato + ADP + $P_i$ | Fígado, rins |
| Fosfoenolpiruvato + $CO_2$ + GDP $\xrightleftharpoons{\text{PEP-carboxicinase}}$ oxaloacetato + GTP | Coração, músculo esquelético |
| Fosfoenolpiruvato + $HCO_3^-$ $\xrightleftharpoons{\text{PEP-carboxilase}}$ oxaloacetato + $P_i$ | Vegetais superiores, leveduras, bactérias |
| Piruvato + $HCO_3^-$ + NAD(P)H $\xrightleftharpoons{\text{Enzima málica}}$ malato + $NAD(P)^+$ | Amplamente distribuída em eucariotos e bactérias |

**MECANISMO-FIGURA 16-17 O papel da biotina na reação catalisada pela piruvato-carboxilase.** A biotina está ligada à enzima por uma ligação amida com o grupo $\varepsilon$-amino de um resíduo de Lys, formando a enzima biotinilada. A reação de carboxilação mediada pela biotina ocorre em duas fases, geralmente catalisadas em sítios ativos separados da enzima, como exemplificado pela reação da piruvato-carboxilase. Na primeira fase (etapas ❶ a ❸), o bicarbonato é convertido a $CO_2$, mais ativo, sendo então utilizado para carboxilar a biotina. A biotina atua como um transportador, carregando o $CO_2$ de um sítio ativo ao outro, localizado em um monômero adjacente da enzima tetramérica (etapa ❹). Na segunda fase (etapas ❺ a ❼), catalisada neste segundo sítio ativo, o $CO_2$ reage com o piruvato para formar oxaloacetato.

(Figura 16-17): primeiro, um grupo carboxil derivado do $HCO_3^-$ é ligado à biotina, sendo então transferido ao piruvato para formar oxaloacetato. Essas duas etapas ocorrem em sítios ativos separados; o longo e flexível braço da biotina transfere os grupos carboxil ativados do primeiro sítio ativo (em um dos monômeros do tetrâmero) ao segundo (no monômero adjacente), funcionando muito similarmente ao longo braço de lipoil-lisina de $E_2$ no complexo da PDH (Figura 16-6) e ao longo braço da porção similar a CoA da proteína transportadora de acilas envolvida na síntese de

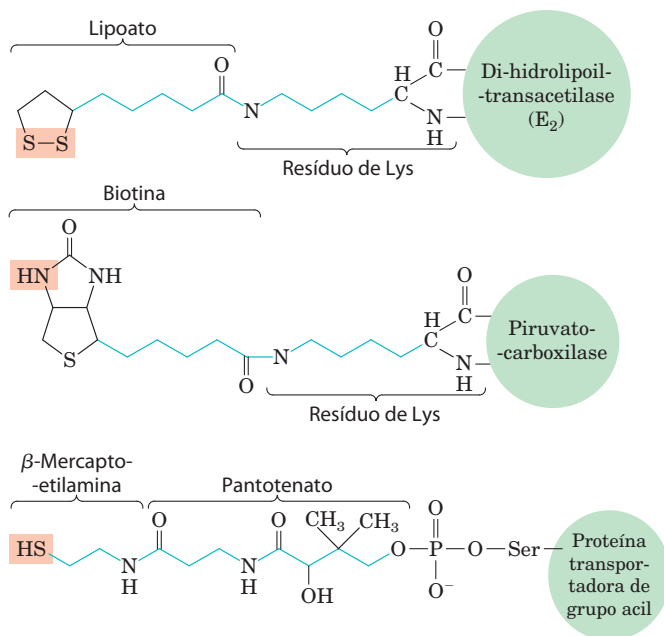



**FIGURA 16-18 Conectores biológicos.** Os cofatores lipoato, biotina e a combinação de β-mercaptoetilamina e pantotenato formam longos braços flexíveis (em azul) nas enzimas às quais estão covalentemente ligados, atuando como conectores que movem os intermediários de um sítio ativo ao outro. O grupo sombreado em vermelho é, em cada caso, o ponto de ligação do intermediário ativado ao conector.

ácidos graxos (ver Figura 21-5); essas proteínas são comparadas na **Figura 16-18**. O lipoato, a biotina e o pantotenato entram nas células por meio do mesmo transportador, todos se tornam covalentemente ligados a proteínas por reações similares, e todos originam um conector flexível que possibilita que os intermediários da reação se movam de um sítio ativo a outro em um complexo enzimático sem dissociarem-se do complexo – isto é, todos participam da canalização do substrato.

A biotina é uma vitamina essencial da dieta humana; ela é abundante em muitos alimentos e é sintetizada por bactérias intestinais. A deficiência de biotina é rara, mas pode algumas vezes ser causada por uma dieta rica em ovos crus. A clara do ovo contém grande quantidade da proteína **avidina** ($M_r$ 70.000), que se liga com muita afinidade à biotina e impede sua absorção no intestino. A avidina do ovo pode ser um mecanismo de defesa para o potencial embrião da ave, inibindo o crescimento de bactérias. Quando os ovos são cozidos, a avidina é desnaturada (e, portanto, inativada), juntamente com todas as outras proteínas da clara do ovo. A avidina purificada é um reagente muito útil na bioquímica e na biologia celular. Uma proteína covalentemente ligada à biotina (obtida experimentalmente ou produzida *in vivo*) pode ser purificada por cromatografia de afinidade (ver Figura 3-17c) com base na forte afinidade da biotina pela avidina. A proteína é, então, eluída da coluna com excesso de biotina livre. A afinidade muito alta da biotina pela avidina também é utilizada em laboratório para unir duas estruturas, agindo como cola molecular (ver Figura 19-27).

## RESUMO 16.2 Reações do ciclo do ácido cítrico

- O ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs, ciclo do ácido tricarboxílico [TCA]) é uma via catabólica central e praticamente universal por meio da qual os compostos derivados da degradação de carboidratos, gorduras e proteínas são oxidados a $CO_2$, com a maior parte da energia da oxidação temporariamente armazenada nos transportadores de elétrons $FADH_2$ e NADH. Durante o metabolismo aeróbio, esses elétrons são transferidos ao $O_2$, e a energia do fluxo de elétrons é capturada na forma de ATP.
- A acetil-CoA entra no ciclo do ácido cítrico (na mitocôndria de eucariotos, no citosol em bactérias) quando a citrato-sintase catalisa sua condensação com o oxaloacetato para a formação de citrato.
- Em sete reações sequenciais, incluindo duas descarboxilações, o ciclo do ácido cítrico converte citrato a oxaloacetato e libera dois $CO_2$. A via é cíclica, de modo que os intermediários não são exauridos; para cada oxaloacetato consumido na via, um é produzido.
- Para cada acetil-CoA oxidada pelo ciclo do ácido cítrico, o ganho de energia consiste em três moléculas de NADH, uma de $FADH_2$ e um nucleosídeo trifosfatado (ATP ou GTP).
- Além da acetil-CoA, qualquer composto que origine um intermediário do ciclo do ácido cítrico com quatro ou cinco carbonos – por exemplo, os produtos da degradação de muitos aminoácidos – podem ser oxidados pelo ciclo.
- O ciclo do ácido cítrico é anfibólico, servindo ao catabolismo e ao anabolismo; os intermediários do ciclo podem ser desviados e utilizados como material de partida para diversos produtos da biossíntese.
- Quando os intermediários são desviados do ciclo do ácido cítrico para outras vias, eles são repostos por algumas reações anapleróticas, que produzem intermediários de quatro carbonos por meio da carboxilação de compostos de três carbonos; essas reações são catalisadas por piruvato-carboxilase, PEP-carboxicinase, PEP-carboxilase e enzima málica. Enzimas que catalisam carboxilações comumente utilizam a biotina para ativar o $CO_2$ e transportá-lo a aceptores, como piruvato ou fosfoenolpiruvato.

## 16.3 Regulação do ciclo do ácido cítrico

Como foi analisado no Capítulo 15, a regulação de enzimas-chave em vias metabólicas, por meio de efetores alostéricos e modificação covalente, garante a produção dos intermediários nas taxas necessárias para manter a célula em um estado de equilíbrio estável enquanto evita o desperdício de uma superprodução. O fluxo de átomos de carbono que entram no ciclo do ácido cítrico a partir do piruvato, e também durante o curso do ciclo, está sob constante regulação em dois níveis: a conversão de piruvato a acetil-CoA, o material de partida do ciclo (a reação da piruvato-desidrogenase), e a entrada da acetil-CoA no ciclo (a reação

da citrato-sintase). A acetil-CoA também é produzida por outras vias que não a reação do complexo da PDH – a maioria das células produz acetil-CoA pela oxidação de ácidos graxos e certos aminoácidos – e a disponibilidade de intermediários a partir dessas vias é importante para a regulação da oxidação do piruvato e do ciclo do ácido cítrico. O ciclo também é regulado nas reações da isocitrato-desidrogenase e da $\alpha$-cetoglutarato-desidrogenase.

## A produção de acetil-CoA pelo complexo piruvato-desidrogenase é regulada por mecanismos alostéricos e covalentes

O complexo da PDH de mamíferos é fortemente inibido por ATP e por acetil-CoA e NADH, os produtos da reação catalisada pelo complexo (**Figura 16-19**). A inibição alostérica da oxidação do piruvato é muito aumentada quando ácidos graxos de cadeia longa estão disponíveis. AMP, CoA e $NAD^+$ se acumulam quando muito pouco acetato flui para dentro do ciclo, ativando alostericamente o complexo da PDH. Portanto, essa enzima é desativada quando o combustível está disponível em grande quantidade, na forma de ácidos graxos e acetil-CoA, e quando as razões celulares [ATP]/[ADP] e [NADH]/[$NAD^+$] estão elevadas, e a enzima é ativada novamente quando a demanda de energia está alta e a célula necessita de um maior fluxo de acetil-CoA para o ciclo do ácido cítrico.

Em mamíferos, esses mecanismos de regulação alostéricos são complementados por um segundo nível de regulação: a modificação covalente das proteínas. O complexo da PDH é inibido pela fosforilação reversível de um resíduo de Ser específico em uma das duas subunidades $E_1$. Como mencionado anteriormente, além das enzimas $E_1$, $E_2$ e $E_3$, o complexo da PDH de mamíferos contém duas proteínas de regulação, cujo único propósito é regular a atividade do complexo. A piruvato-desidrogenase-cinase fosforila e, dessa maneira, inativa $E_1$, enquanto uma fosfoproteína-fosfatase específica remove o grupo fosfato por hidrólise e, desta maneira, ativa $E_1$. A cinase é alostericamente ativada por ATP: quando a [ATP] está elevada (refletindo um suprimento de energia adequado), o complexo da PDH é inativado pela fosforilação de $E_1$. Quando [ATP] diminui, a atividade da cinase diminui e a ação da fosfatase remove o grupo fosfato de $E_1$, ativando o complexo.

O complexo da PDH de plantas, localizado na matriz mitocondrial e em plastídeos, é inibido por seus produtos,

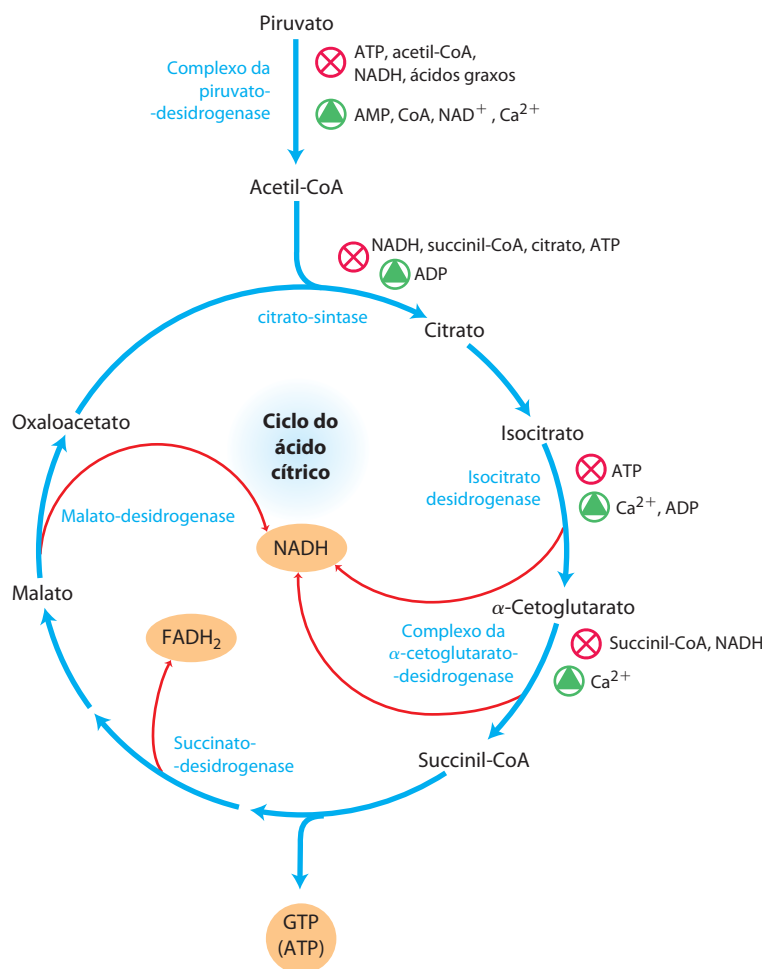



**FIGURA 16-19 Regulação do fluxo dos metabólitos a partir do complexo da PDH durante o ciclo do ácido cítrico em mamíferos.** O complexo da PDH é alostericamente inibido quando as razões [ATP]/[ADP], [NADH]/[$NAD^+$] e [acetil--CoA]/[CoA] estão elevadas, indicando um estado metabólico com energia suficiente. Quando estas razões decrescem, o resultado é a ativação alostérica da oxidação do piruvato. A velocidade do fluxo pelo ciclo do ácido cítrico pode ser limitada pela disponibilidade dos substratos da citrato-sintase, oxaloacetato e acetil-CoA, ou de $NAD^+$, o qual é exaurido pela conversão a NADH, retardando as três etapas de oxidação dependentes de NAD. A inibição por retroalimentação por succinil-CoA, citrato e ATP também diminui a velocidade do ciclo pela inibição de etapas iniciais. No tecido muscular, o $Ca^{2+}$ estimula a contração e, como mostrado aqui, estimula o metabolismo gerador de energia para repor o ATP consumido durante a contração.

NADH e acetil-CoA. A enzima mitocondrial vegetal também é regulada pela fosforilação reversível; o piruvato inibe a cinase, ativando o complexo da PDH, e $NH_4^+$ estimula a cinase, causando a inativação do complexo. O complexo da PDH de *E. coli* está sob regulação alostérica similar àquela da enzima de mamíferos, mas não parece ser regulado por fosforilação.

## O ciclo do ácido cítrico é regulado nas três etapas exergônicas

O fluxo de metabólitos durante o curso do ciclo do ácido cítrico é mantido sob regulação rigorosa. Três fatores controlam a velocidade do fluxo no ciclo: disponibilidade de substrato, inibição pelos produtos acumulados e inibição alostérica por retroalimentação das enzimas que catalisam as etapas iniciais do ciclo.

Cada uma das três etapas fortemente exergônicas do ciclo – aquelas catalisadas por citrato-sintase, isocitrato-desidrogenase e $\alpha$-cetoglutarato-desidrogenase (Figura 16-19) – podem tornar-se a etapa limitante da velocidade sob algumas circunstâncias. A disponibilidade dos substratos da citrato-sintase (acetil-CoA e oxaloacetato) varia com o estado metabólico da célula e, às vezes, limita a taxa de formação de citrato. O NADH, produto da oxidação do citrato e do $\alpha$-cetoglutarato, acumula-se sob determinadas condições, e em alta [NADH]/[$NAD^+$] ambas as reações de desidrogenação são fortemente inibidas pela ação das massas. Na célula, de maneira similar, a reação da malato-desidrogenase está essencialmente em equilíbrio (ou seja, é limitada pelo substrato), e quando a [NADH]/[$NAD^+$] está alta, a concentração de oxaloacetato está baixa, desacelerando a primeira etapa do ciclo. O acúmulo de produto inibe as três etapas limitantes do ciclo: a succinil-CoA inibe a $\alpha$-cetoglutarato-desidrogenase (e também a citrato-sintase); o citrato bloqueia a citrato-sintase; e o produto final, ATP, inibe a citrato-sintase e a isocitrato-desidrogenase. A inibição da citrato-sintase pelo ATP é abrandada por ADP, um ativador alostérico dessa enzima. Nos músculos dos vertebrados, $Ca^{2+}$, o sinalizador para a contração e o aumento concomitante na demanda de ATP, ativa a isocitrato-desidrogenase e a $\alpha$-cetoglutarato-desidrogenase, assim como ativa o complexo da PDH. Dessa forma, as concentrações dos substratos e dos intermediários do ciclo do ácido cítrico ajustam o fluxo dessa via para a velocidade que forneça as concentrações ótimas de ATP e NADH.

Sob condições normais, as velocidades da glicólise e do ciclo do ácido cítrico estão integradas de modo que a quantidade de glicose metabolizada a piruvato seja exatamente a quantidade suficiente para suprir o ciclo do ácido cítrico com o seu combustível, os grupos acetil da acetil-CoA. Piruvato, lactato e acetil-CoA normalmente são mantidos nas concentrações do estado estacionário. A velocidade da glicólise é vinculada à velocidade do ciclo do ácido cítrico não apenas por meio da inibição pelos altos níveis de ATP e NADH, os quais são comuns a ambos os estágios da oxidação da glicose, a via glicolítica e a respiração, mas também é regulada pela concentração de citrato. Citrato, o produto da primeira etapa do ciclo do ácido cítrico, é um importante inibidor alostérico da fosfofrutocinase-1 na via glicolítica (ver Figura 15-16).

## A canalização do substrato em complexos multienzimáticos pode ocorrer durante o ciclo do ácido cítrico

Embora as enzimas do ciclo do ácido cítrico normalmente sejam descritas como componentes solúveis da matriz mitocondrial (exceto pela succinato-desidrogenase, que é ligada à membrana), evidências crescentes sugerem que, dentro da mitocôndria, essas enzimas existem como complexos multienzimáticos. A abordagem clássica da enzimologia – a purificação de proteínas isoladas a partir de extratos de células lisadas – foi utilizada com grande sucesso para as enzimas do ciclo do ácido cítrico. Entretanto, a primeira "vítima" da lise celular é o alto nível de organização da célula – as interações não covalentes e reversíveis de uma proteína com a outra, ou entre enzimas e algum componente estrutural, como membranas, microtúbulos ou microfilamentos. Quando as células são rompidas, seus conteúdos, incluindo enzimas, são diluídos 100 ou 1.000 vezes (**Figura 16-20**).

Vários tipos de evidências sugerem que, nas células, os complexos multienzimáticos asseguram a passagem

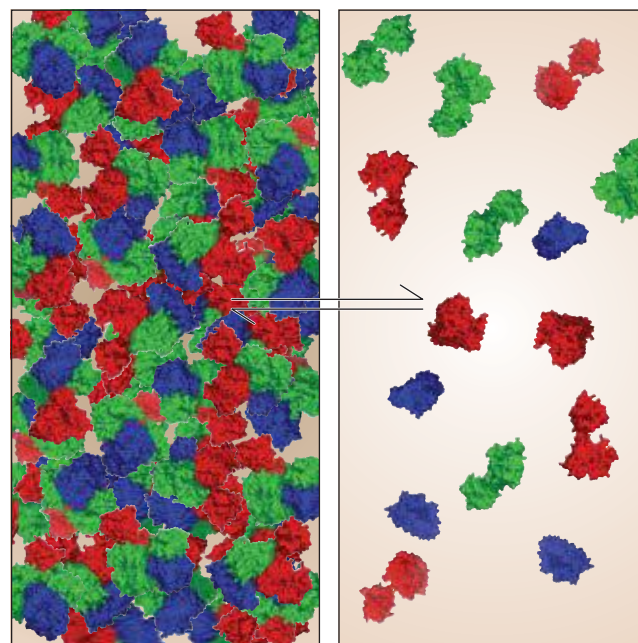



**FIGURA 16-20** A diluição de uma solução contendo um complexo proteico não ligado covalentemente – como um constituído por três enzimas (ilustradas aqui em vermelho, azul e verde) – favorece a dissociação do complexo em seus constituintes.

eficiente do produto de uma reação enzimática para a próxima enzima da via. Tais complexos são chamados de **metabolons**. Certas enzimas do ciclo do ácido cítrico têm sido isoladas em conjunto como complexos supramoleculares, ou têm sido encontradas em associação com a membrana mitocondrial interna, ou se difundem na matriz mitocondrial mais lentamente do que o esperado para proteínas isoladas em solução. Existem fortes evidências da canalização de substratos por complexos multienzimáticos em outras vias metabólicas, e muitas enzimas consideradas "solúveis" provavelmente atuam na célula em complexos altamente organizados que canalizam intermediários. Outros exemplos de canalização serão fornecidos na discussão da biossíntese de aminoácidos e nucleotídeos, no Capítulo 22.

## Algumas mutações em enzimas do ciclo do ácido cítrico levam ao desenvolvimento de câncer

Quando os mecanismos da regulação de uma via como o ciclo do ácido cítrico são afetados por uma perturbação metabólica importante, o resultado pode ser uma doença grave. São raríssimas as mutações nas enzimas do ciclo do ácido cítrico em humanos e outros mamíferos, mas quando ocorrem são devastadoras. Defeitos genéticos no gene da fumarase levam a tumores no músculo liso (leiomas) e nos rins; mutações na succinato-desidrogenase levam a tumores da glândula suprarrenal (feocromocitomas). Nas células em cultura com essas mutações, o fumarato (no caso das mutações na fumarase) e, em menor extensão, o succinato (no caso das mutações na succinato-desidrogenase) acumulam-se, e esse acúmulo induz a expressão do fator de transcrição induzível por hipoxia HIF-1$\alpha$ (HIF, de *hipoxia-inducible transcription factor*) (ver Quadro 14-1). O mecanismo que leva à formação do tumor pode ser a geração de um estado de pseudo-hipoxia. Nas células com essas mutações, ocorre maior expressão dos genes normalmente regulados por HIF-1$\alpha$. Esses efeitos das mutações nos genes da fumarase e da succinato-desidrogenase os definem como genes supressores de tumor (p. 489).

Outra conexão marcante entre os intermediários do ciclo do ácido cítrico e câncer é a descoberta que, em muitos tumores das células da glia (gliomas), a isocitrato-desidrogenase dependente de NADPH apresenta um defeito genético incomum. A enzima mutante perde sua atividade normal (converte isocitrato a $\alpha$-cetoglutarato), mas *ganha* uma nova atividade: ela converte $\alpha$-cetoglutarato a 2-hidroxiglutarato (**Figura 16-21**), que acumula nas células tumorais. $\alpha$-Cetoglutarato e $Fe^{3+}$ são cofatores essenciais para uma família de histonas-desmetilases que alteram a expressão gênica por meio da remoção de grupos metil de resíduos de Arg e Lys nas histonas que organizam o DNA nuclear. Por competir com o $\alpha$-cetoglutarato pela ligação às histonas-desmetilases, o 2-hidroxiglutarato inibe a atividade dessas enzimas. A inibição das histonas-desmetilases, por sua vez, interfere com a regulação gênica normal, levando ao crescimento descontrolado das células da glia. ■

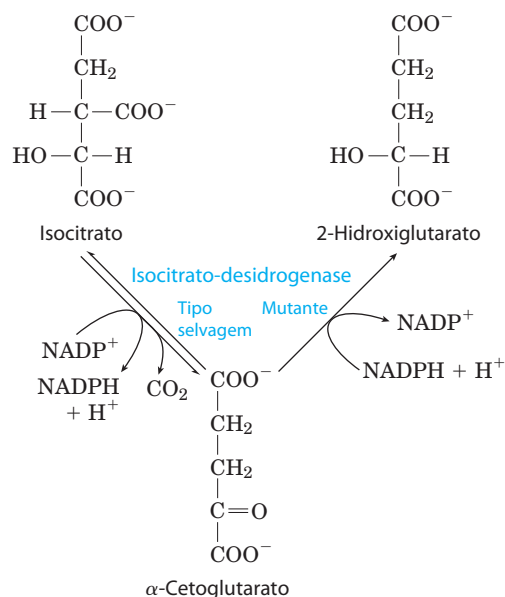



**FIGURA 16-21 Uma isocitrato-desidrogenase mutante adquire uma nova função.** A isocitrato-desidrogenase do tipo selvagem catalisa a conversão de isocitrato a $\alpha$-cetoglutarato, porém mutações que alteram o sítio de ligação do isocitrato levam a perda da função da atividade enzimática normal e ao ganho de uma nova atividade: conversão de $\alpha$-cetoglutarato a 2-hidroxiglutarato. O acúmulo deste produto inibe a histona-desmetilase, alterando a regulação gênica e levando a tumores das células gliares no cérebro.

### RESUMO 16.3 Regulação do ciclo do ácido cítrico

- A velocidade global do ciclo do ácido cítrico é controlada pela taxa de conversão do piruvato a acetil-CoA e pelo fluxo pelas enzimas citrato-sintase, isocitrato-desidrogenase e $\alpha$-cetoglutarato-desidrogenase. Esses fluxos são determinados pelas concentrações dos substratos e dos produtos: os produtos finais ATP e NADH são inibidores, e os substratos $NAD^+$ e ADP são estimuladores.
- A produção de acetil-CoA para o ciclo do ácido cítrico pelo complexo da PDH é inibida alostericamente pelos metabólitos que sinalizam a suficiência de energia metabólica (ATP, acetil-CoA, NADH e ácidos graxos), sendo estimulada pelos metabólitos que indicam um suprimento de energia reduzido (AMP, $NAD^+$, CoA).
- Os complexos formados por enzimas em sequência em uma via possibilitam a canalização do substrato entre essas enzimas.

## 16.4 Ciclo do glioxilato

Os vertebrados não conseguem converter ácidos graxos, ou o acetato derivado deles, a carboidratos. As conversões de fosfoenolpiruvato a piruvato (p. 554) e de piruvato a acetil-CoA (Figura 16-2) de tão exergônicas são essencialmente irreversíveis. Se uma célula não consegue converter acetato a fosfoenolpiruvato, o acetato não pode ser o material de partida para a via gliconeogênica, que leva de fosfoenolpiruvato a glicose (ver Figura 15-13). Sem essa capacidade,

portanto, uma célula ou organismo é incapaz de converter combustíveis ou metabólitos que são degradados a acetato (ácidos graxos e certos aminoácidos) em carboidratos.

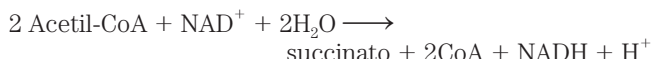
Como mencionado na discussão sobre reações anapleróticas (Tabela 16-2), o fosfoenolpiruvato pode ser sintetizado a partir de oxaloacetato em uma reação reversível catalisada pela PEP-carboxicinase:

$$\text{Oxaloacetato} + \text{GTP} \rightleftharpoons \text{fosfoenolpiruvato} + CO_2 + \text{GDP}$$

Como os átomos de carbono das moléculas de acetato que entram no ciclo do ácido cítrico aparecem oito etapas depois no oxaloacetato, pode parecer que esta via pode produzir oxaloacetato a partir de acetato e, assim, originar fosfoenolpiruvato para a gliconeogênese. Contudo, como mostrado por um exame da estequiometria do ciclo do ácido cítrico, não há conversão *líquida* de acetato a oxaloacetato; nos vertebrados, para cada dois carbonos que entram no ciclo na forma de acetil-CoA, dois são liberados na forma de $CO_2$. Em muitos organismos que não os vertebrados, o ciclo do glioxilato funciona como mecanismo para a conversão de acetato a carboidratos.

## O ciclo do glioxilato produz compostos de quatro carbonos a partir de acetato

Em plantas, certos invertebrados e alguns microrganismos (incluindo *E. coli* e levedura), o acetato pode ser tanto um combustível rico em energia como uma fonte de fosfoenolpiruvato para a síntese de carboidratos. Nesses organismos, as enzimas do **ciclo do glioxilato** catalisam a conversão líquida de acetato a succinato ou outros intermediários de quatro carbonos do ciclo do ácido cítrico:

$$2\ \text{Acetil-CoA} + NAD^+ + 2H_2O \longrightarrow \text{succinato} + 2\text{CoA} + \text{NADH} + H^+$$

No ciclo do glioxilato, a acetil-CoA é condensada com o oxaloacetato para formar citrato, e o citrato é convertido a isocitrato, exatamente como no ciclo do ácido cítrico. A próxima etapa, porém, não é a quebra do isocitrato pela isocitrato-desidrogenase, mas a clivagem do isocitrato pela **isocitrato-liase**, formando succinato e **glioxilato**. O glioxilato, então, é condensado com uma segunda molécula de acetil-CoA para a geração de malato, em uma reação catalisada pela **malato-sintase**. O malato é posteriormente oxidado a oxaloacetato, o qual pode ser condensado com outra molécula de acetil-CoA para iniciar outra volta do ciclo (**Figura 16-22**). Cada volta do ciclo do glioxilato consome duas moléculas de acetil-CoA e produz uma molécula de succinato, que está, então, disponível aos propósitos biossintéticos. O succinato pode ser convertido via fumarato e malato a oxaloacetato, o qual pode, então, ser convertido a fosfoenolpiruvato pela PEP--carboxicinase, e, assim, a glicose pela gliconeogênese. Os vertebrados não têm as enzimas específicas do ciclo do glioxilato (isocitrato-liase e malato-sintase) e, portanto, não conseguem realizar a síntese líquida de glicose a partir de lipídeos.

Em plantas, as enzimas do ciclo do glioxilato estão sequestradas em organelas delimitadas por membrana chamadas de glioxissomos, os quais são peroxissomos especializados (**Figura 16-23**). As enzimas comuns ao ciclo do ácido cítrico e do glioxilato têm duas isoenzimas, uma específica das mitocôndrias, outra específica dos glioxissomos. Os glioxissomos nem sempre estão presentes em todos os tecidos vegetais. Eles se desenvolvem nas sementes ricas em lipídeos durante a germinação, antes de a planta adquirir a capacidade de produzir glicose pela fotossíntese. Além das enzimas do ciclo do glioxilato, os glioxissomos contêm todas as enzimas necessárias para a degradação dos ácidos graxos estocados nos óleos das sementes (ver Figura 17-14). A acetil-CoA formada pela degradação dos lipídeos é convertida a succinato, via ciclo do glioxilato, e o succinato é exportado para a mitocôndria, onde as enzimas do ciclo do ácido cítrico o transformam em malato. Uma isoenzima citosólica da malato-desidrogenase oxida malato a oxaloacetato, um precursor para a gliconeogênese. As sementes em germinação podem, assim, converter em glicose os carbonos dos lipídeos estocados.

**FIGURA 16-22 Ciclo do glioxilato.** A citrato-sintase, a aconitase e a malato-desidrogenase do ciclo do glioxilato são isoenzimas das enzimas do ciclo do ácido cítrico; isocitrato-liase e malato-sintase são exclusivas do ciclo do glioxilato. Observe que dois grupos acetil (em cor salmão) entram no ciclo e quatro carbonos saem na forma de succinato (em azul). O ciclo do glioxilato foi elucidado por Hans Kornberg e Neil Madsen no laboratório de Hans Krebs.

**FIGURA 16-23** Micrografia eletrônica de uma semente de pepino em germinação, mostrando glioxissomo, mitocôndrias e corpos lipídicos circundantes.

## Os ciclos do ácido cítrico e do glioxilato são regulados coordenadamente

Nas sementes em germinação, as transformações enzimáticas dos ácidos dicarboxílico e tricarboxílico ocorrem em três compartimentos intracelulares: mitocôndrias, glioxissomos e citosol. Existe um constante intercâmbio de metabólitos entre esses compartimentos (**Figura 16-24**).

O esqueleto de carbono do oxaloacetato originado pelo ciclo do ácido cítrico (na mitocôndria) é transportado ao glioxissomo na forma de aspartato. O aspartato é convertido a oxaloacetato, que se condensa com a acetil-CoA derivada da degradação dos ácidos graxos. O citrato assim formado é convertido a isocitrato pela aconitase, sendo então dividido em glioxilato e succinato pela isocitrato-liase. O succinato retorna à mitocôndria, entra novamente no ciclo do ácido cítrico e é transformado em malato, que vai para o citosol e é oxidado (pela malato-desidrogenase citosólica) a oxaloacetato. O oxaloacetato é convertido, via gliconeogênese, a hexoses e sacarose, as quais podem ser transportadas às raízes e aos brotos em crescimento. Quatro vias distintas participam destas conversões: degradação dos ácidos graxos a acetil-CoA (nos glioxissomos), ciclo do glioxilato (nos glioxissomos), ciclo do ácido cítrico (nas mitocôndrias) e gliconeogênese (no citosol).

O compartilhamento de intermediários comuns requer que essas vias sejam reguladas de forma coordenada. O isocitrato é um intermediário crucial, no ponto de ramificação entre os ciclos do glioxilato e do ácido cítrico (**Figura 16-25**). A isocitrato-desidrogenase é regulada por modificação covalente: uma proteína-cinase específica fosforila, e assim inativa a desidrogenase. Essa inativação desvia isocitrato para o ciclo do glioxilato, onde ele inicia a via sintética para a produção de glicose. Uma fosfoproteína-fosfatase remove o grupo fosfato da isocitrato-desidrogenase, reativando a enzima e lançando mais isocitrato para geração de energia pelo ciclo do ácido cítrico. As atividades cinásica e fosfatásica de regulação são atividades enzimáticas separadas de um único polipeptídeo.

Algumas bactérias, incluindo *E. coli*, têm o conjunto completo de enzimas para o ciclos do glioxilato e do ácido cítrico no citosol, podendo, portanto, crescer utilizando acetato como única fonte de carbono e energia. A fosfoproteína-fosfatase que ativa a isocitrato-desidrogenase é estimulada por intermediários do ciclo do ácido cítrico e da glicólise, sendo inibida pelos indicadores de suprimento

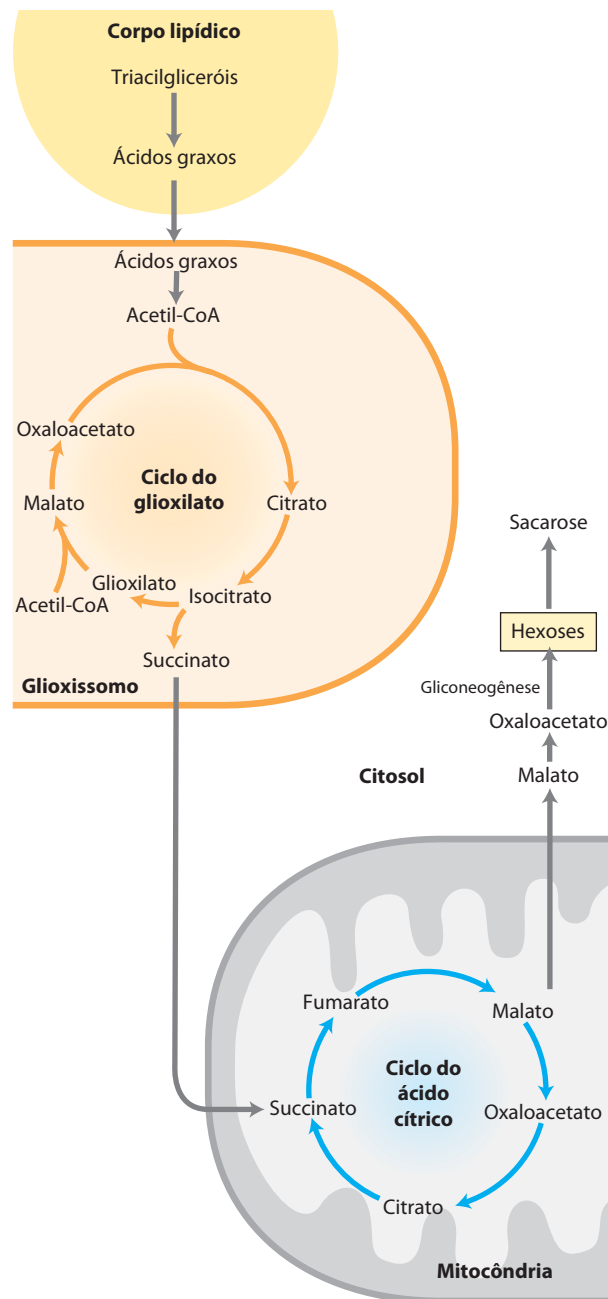



**FIGURA 16-24 Relações entre os ciclos do glioxilato e do ácido cítrico.** As reações do ciclo do glioxilato (nos glioxissomos) acontecem simultaneamente, entrelaçando-se com as reações do ciclo do ácido cítrico (nas mitocôndrias), conforme os intermediários passam por estes compartimentos. A conversão de succinato a oxaloacetato é catalisada pelas enzimas do ciclo do ácido cítrico. A oxidação de ácidos graxos a acetil-CoA está descrita no Capítulo 17; a síntese de hexoses a partir de oxaloacetato está descrita no Capítulo 20.

**FIGURA 16-25 Regulação coordenada dos ciclos do glioxilato e do ácido cítrico.** A regulação da atividade da isocitrato-desidrogenase determina o participação alternada do isocitrato entre os ciclos do glioxilato e do ácido cítrico. Quando a enzima está inativada por fosforilação (por uma proteína-cinase específica), o isocitrato é direcionado para reações biossintéticas, via ciclo do glioxilato. Quando a enzima é ativada por desfosforilação (por uma fosfatase específica), o isocitrato entra no ciclo do ácido cítrico e ATP é produzido.

reduzido de energia (Figura 16-25). Os mesmos metabólitos *inibem* a atividade cinásica do polipeptídeo bifuncional. Desse modo, o acúmulo de intermediários das principais vias de produção de energia – indicando o esgotamento de energia – resulta na ativação da isocitrato-desidrogenase. Quando a concentração desses reguladores diminui, sinalizando um fluxo suficiente para a produção de energia pelo ciclo do ácido cítrico, a isocitrato-desidrogenase é inativada pela proteína-cinase.

Os mesmos intermediários da glicólise e do ciclo do ácido cítrico que ativam a isocitrato-desidrogenase são inibidores alóstericos da isocitrato-liase. Quando o metabolismo gerador de energia está suficientemente rápido e mantém baixas as concentrações dos intermediários glicolíticos e do ciclo do ácido cítrico, a isocitrato-desidrogenase é inativada, a inibição da isocitrato-liase é abrandada e o isocitrato flui para a via do glioxilato, para ser utilizado na biossíntese de carboidratos, aminoácidos e outros componentes celulares.

## RESUMO 16.4 Ciclo do glioxilato

- O ciclo do glioxilato está ativo nas sementes em germinação de algumas plantas e em certos microrganismos que conseguem viver utilizando acetato como a única fonte de carbono. Nas plantas, essa via ocorre nos glioxissomos dos brotos. Ela inclui algumas enzimas do ciclo do ácido cítrico e duas enzimas adicionais: isocitrato-liase e malato-sintase.
- No ciclo do glioxilato, o desvio das duas etapas de descarboxilação do ciclo do ácido cítrico torna possível a formação *líquida* de succinato, oxaloacetato e outros intermediários do ciclo do ácido cítrico a partir de acetil-CoA. O oxaloacetato formado deste modo pode ser utilizado para a síntese de glicose via gliconeogênese.
- Os vertebrados carecem das enzimas do ciclo do glioxilato e não conseguem sintetizar glicose a partir do acetato ou dos ácidos graxos que dão origem à acetil-CoA.
- A participação alternada do isocitrato do ciclo do ácido cítrico e do ciclo do glioxilato é controlada no nível da isocitrato-desidrogenase, a qual é regulada por fosforilação reversível.

## Termos-chave

*Os termos em negrito estão definidos no glossário.*



## Leituras adicionais

### Geral

**Holmes, F.L.** (1990, 1993) *Hans Krebs*, Vol 1: *Formation of a Scientific Life, 1900–1933*; Vol. 2: *Architect of Intermediary Metabolism, 1933–1937*, Oxford University Press, Oxford.
Biografia da trajetória científica e pessoal de Krebs, escrita por um célebre historiador da ciência, com a descrição completa do trabalho que revelou os ciclos da ureia e do ácido cítrico.

**Kay, J. & Weitzman, P.D.J. (eds).** (1987) *Krebs' Citric Acid Cycle: Half a Century and Still Turning*, Biochemical Society Symposium **54**, The Biochemical Society, London.

Livro com múltiplos autores sobre o ciclo do ácido cítrico, incluindo genética molecular, mecanismos de regulação, variações do ciclo em microrganismos de nichos ecológicos incomuns e evolução da via. Especialmente relevantes são os capítulos de H. Gest (As raízes evolutivas do ciclo do ácido cítrico em procariotos) W.H. Holms (Controle do fluxo por meio do ciclo do ácido cítrico e o desvio do glioxilato em *Escherichia coli*) e R.N. Perham et al. (Complexos da α-cetoácido-desidrogenases).

## Complexo da piruvato-desidrogenase

**Harris, R.A., Bowker-Kinley, M.M., Huang, B., & Wu, P.** (2002) Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex. *Adv. Enzyme Regul*. **42**, 249–259.

**Milne, J.L.S., Shi, D., Rosenthal, P.B., Sunshine, J.S., Domingo, G.J., Wu, X., Brooks, B.R., Perham, R.N., Henderson, R., & Subramaniam, S.** (2002) Molecular architecture and mechanism of an icosahedral pyruvate dehydrogenase complex: a multifunctional catalytic machine. *EMBO J*. **21**, 5587–5598.

Bela ilustração do poder da metodologia para a reconstrução de imagens aliada à microscopia crioeletrônica, aqui utilizada para desenvolver um modelo plausível da estrutura do complexo da PDH. Compare este modelo com aquele no artigo de Zhou et al. (a seguir).

**Perham, R.N.** (2000) Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: catalytic machines for multistep reactions. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 961–1004.

Revisão sobre o papel dos braços flexíveis contendo lipoato, biotina e pantotenato na canalização do substrato em complexos multienzimáticos.

**Zhou, Z.H., McCarthy, D.B., O'Conner, C.M., Reed, L.J., & Stoops, J.K.** (2001) The remarkable structural and functional organization of the eukaryotic pyruvate dehydrogenase complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14,802–14,807.

Outro artigo impressionante no qual a reconstrução de imagens e a microscopia crioeletrônica originam um modelo para o complexo da PDH. Compare este modelo com aquele no artigo de Milne et al. (anteriormente).

## Enzimas do ciclo do ácido cítrico

**de la Fuente, J.M., Ramírez-Rodríguez, V., Cabrera-Ponce, J.L., & Herrera-Estrella, L.** (1997) Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* **276**, 1566–1568.

**Fraser, M.D., James, M.N., Bridger, W.A., & Wolodko, W.T.** (1999) A detailed structural description of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase. *J. Mol. Biol.* **285**, 1633–1653. (Veja também a errata em *J. Mol. Biol.* **288**, 501 [1998].)

**Goward, C.R. & Nicholls, D.J.** (1994) Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Sci.* **3**, 1883–1888.

Uma curta e boa revisão.

**Hagerhall, C.** (1997) Succinate: quinone oxidoreductases: variations on a conserved theme. *Biochim. Biophys. Acta* **1320**, 107–141.

Uma revisão sobre a estrutura e a função das succinato-desidrogenases.

**Hanson, R.W.** (2009) Thematic minireview series: a perspective on the biology of phosphoenolpyruvate carboxykinase 55 years after its discovery. *J. Biol. Chem.* **284**, 27,021–27,023.

Introdução editorial a uma série de revisões curtas sobre a PEP-carboxicinase neste exemplar da revista.

**Jitrapakdee, S., St. Maurice, M., Rayment, I., Cleland, W.W., Wallace, J.C., & Attwood, P.V.** (2008) Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem. J*. **413**, 369–387.

**Ma, J.F., Ryan, P.R., & Delhaize, E.** (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci*. **6**, 273–278.

**Matte, A., Tari, L.W., Goldie, H., & Delbaere, L.T.J.** (1997) Structure and mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 8105–8108.

**Ovadi, J. & Srere, P.** (2000) Macromolecular compartmentation and channeling. *Int. Rev. Cytol.* **192**, 255–280.

Aprofundada revisão sobre as evidências em canalização e metabolons.

**Prensner, J.R. & Chinnaiyan, A.M.** (2011) Metabolism unhinged: IDH mutations in cancer. *Nat. Med.* **17**, 291–293.

Sucinta revisão sobre as mutações da isocitrato-desidrogenase associadas com câncer.

**Remington, S.J.** (1992) Structure and mechanism of citrate synthase. *Curr. Top. Cell. Regul.* **33**, 209–229.

Completa revisão sobre a enzima citrato-sintase.

**Singer, T.P. & Johnson, M.K.** (1985) The prosthetic groups of succinate dehydrogenase: 30 years from discovery to identification. *FEBS Lett.* **190**, 189–198.

Descrição da estrutura e da função dos centros de ferro-enxofre na succinato-desidrogenase.

**Weigand, G. & Remington, S.J.** (1986) Citrate synthase: structure, control, and mechanism. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem*. **15**, 97-117.

**Wolodko, W.T., Fraser, M.E., James, M.N.G., & Bridger, W.A.** (1994) The crystal structure of succinyl-CoA synthetase from *Escherichia coli* at 2.5-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **269**, 10,883–10,890.

**Yang, J., Kalhan, S.C., & Hanson, R.W.** (2009) What is the metabolic role of phosphenolpyruvate carboxykinase? *J. Biol. Chem.* **284**, 27,025–27,029.

Breve revisão sobre as diversas funções desta enzima.

## Enzimas com mais de uma função

**Eisenstein, R.S.** (2000) Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu. Rev. Nutr*. **20**, 627–662.

**Flores, C.-L. & Gancedo, C.** (2011) Unraveling moonlighting functions with yeasts. *IUBMB Life* **63**, 457–462.

**Jeffery, C.J.** (1999) Moonlighting proteins. *Trends Biochem. Sci*. **24**, 8-11.

**Kim, J.-W. & Dang, C.V.** (2006) Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 142–150.

Revisão em nível intermediário sobre as enzimas com mais de uma função.

**Rouault, T.A.** (2006) The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat. Chem. Biol*. **2**, 406–414.

Revisão avançada.

## Regulação do ciclo do ácido cítrico

**Briere, J.-J., Favier, J., Gimenez-Roqueplo, A.-P., & Rustin, P.** (2006) Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **291**, 1114–1120.

Revisão em nível intermediário sobre os efeitos clínicos das mutações na succinato-desidrogenase, na fumarase e na α-cetoglutarato-desidrogenase.

**Hansford, R.G.** (1980) Control of mitochondrial substrate oxidation. *Curr. Top. Bioenerget.* **10**, 217–278.

Detalhada revisão sobre a regulação do ciclo do ácido cítrico.

**Kaplan, N.O.** (1985) The role of pyridine nucleotides in regulating cellular metabolism. *Curr. Top. Cell. Regul.* **26**, 371–381.

Excelente discussão geral sobre a importância da razão [NADH]/[$NAD^+$] na regulação celular.

**King, A., Selak, M.A., & Gottlieb, E.** (2006) Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene* **25**, 4675–4682.

**Reed, L.J., Damuni, Z., & Merryfield, M.L.** (1985) Regulation of mammalian pyruvate and branched-chain $\alpha$-keto acid dehydrogenase complexes by phosphorylation-dephosphorylation. *Curr. Top. Cell. Regul.* **27**, 41–49.

### Ciclo do glioxilato

**Eastmond, P.J. & Graham, I.A.** (2001) Reexamining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends Plant Sci.* **6**, 72–77.

Revisão em nível intermediário sobre os estudos do ciclo do glioxilato em *Arabidopsis*.

**Holms, W.H.** (1986) The central metabolic pathways of *Escherichia coli:* relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Curr. Top. Cell. Regul.* **28**, 69–106.

## Problemas

**1. O balancete do ciclo do ácido cítrico.** O ciclo do ácido cítrico tem oito enzimas: citrato-sintase, aconitase, isocitrato-desidrogenase, $\alpha$-cetoglutarato-desidrogenase, succinil-CoA-sintetase, succinato-desidrogenase, fumarase e malato-desidrogenase.

(a) Escreva uma equação equilibrada para a reação catalisada por cada enzima.

(b) Identifique o(s) cofator(es) necessário(s) para cada reação enzimática.

(c) Para cada enzima, determine qual dos seguintes descreve o tipo de reação(ões) catalisada(s): condensação (formação de ligação carbono-carbono); desidratação (perda de água); hidratação (adição de água); descarboxilação (perda de $CO_2$); oxidação-redução; fosforilação em nível de substrato; isomerização.

(d) Escreva uma reação líquida equilibrada para o catabolismo de acetil-CoA a $CO_2$.

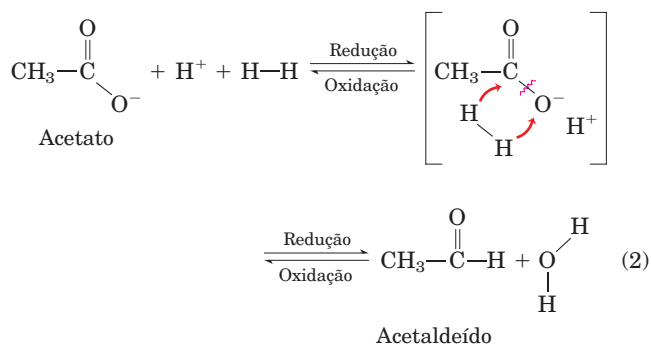
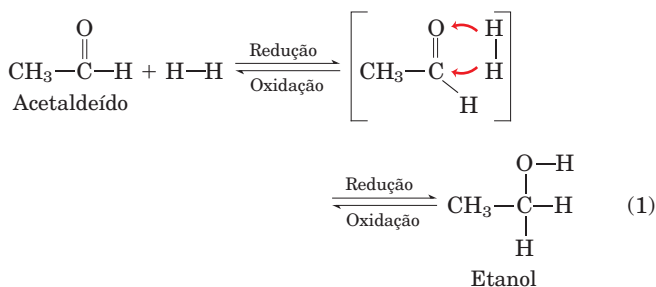
**2. Equação líquida da glicólise e do ciclo do ácido cítrico.** Escreva a equação bioquímica líquida do metabolismo de uma molécula de glicose pela glicólise e pelo ciclo do ácido cítrico, incluindo todos os cofatores.

**3. A identificação das reações de oxidação e redução.** Uma estratégia bioquímica de muitos organismos vivos é a oxidação gradual de compostos orgânicos a $CO_2$ e $H_2O$ e a conservação da maior parte da energia assim produzida na forma de ATP. É importante ser capaz de reconhecer os processos de oxidação e redução do metabolismo. A redução de uma molécula orgânica é o resultado da hidrogenação de uma ligação dupla (Equação 1, abaixo) ou de uma ligação simples com clivagem concomitante (Equação 2). Por outro lado, a oxidação é o resultado da desidrogenação. Nas reações bioquímicas redox, as coenzimas NAD e FAD desidrogenam/hidrogenam moléculas orgânicas na presença das enzimas apropriadas.

$$CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-H + H-H \underset{\text{Oxidação}}{\overset{\text{Redução}}{\rightleftharpoons}} [\text{intermediário}] \underset{\text{Oxidação}}{\overset{\text{Redução}}{\rightleftharpoons}} CH_3-\overset{O-H}{\overset{|}{\underset{H}{\underset{|}{C}}}}-H \quad (1)$$

Acetaldeído → Etanol

$$CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O^- + H^+ + H-H \underset{\text{Oxidação}}{\overset{\text{Redução}}{\rightleftharpoons}} [\text{intermediário}\ H^+] \underset{\text{Oxidação}}{\overset{\text{Redução}}{\rightleftharpoons}} CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-H + H-O-H \quad (2)$$

Acetato → Acetaldeído

Para cada uma das transformações metabólicas de (a) a (h), determine se ocorreu uma oxidação ou uma redução. Equilibre cada transformação pela inserção de H–H e, onde necessário, $H_2O$.

(a) $CH_3-OH \longrightarrow H-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-H$
Metanol → Formaldeído

(b) $H-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-H \longrightarrow H-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O^- + H^+$
Formaldeído → Formato

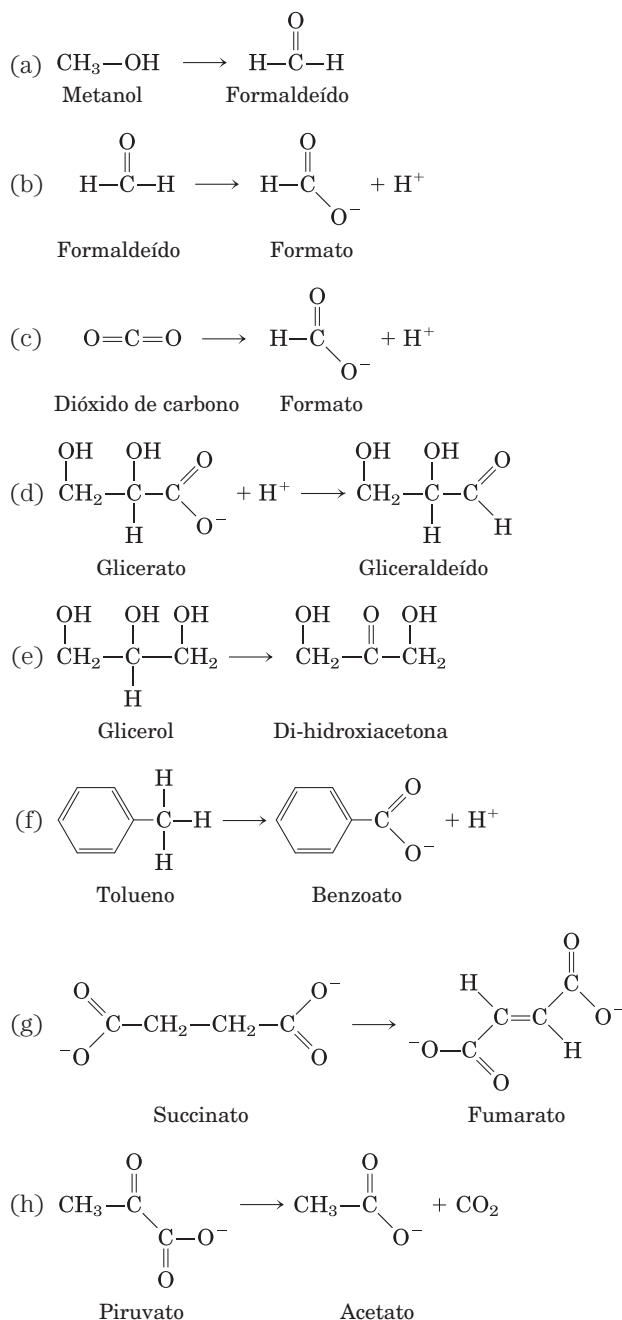
(c) $O=C=O \longrightarrow H-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O^- + H^+$
Dióxido de carbono → Formato

(d) $CH_2(OH)-CH(OH)-COO^- + H^+ \longrightarrow CH_2(OH)-CH(OH)-CHO$
Glicerato → Gliceraldeído

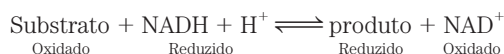
(e) $CH_2(OH)-CH(OH)-CH_2(OH) \longrightarrow CH_2(OH)-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_2(OH)$
Glicerol → Di-hidroxiacetona

(f) $C_6H_5-CH_3 \longrightarrow C_6H_5-COO^- + H^+$
Tolueno → Benzoato

(g) $^-OOC-CH_2-CH_2-COO^- \longrightarrow\ ^-OOC-CH=CH-COO^-$
Succinato → Fumarato

(h) $CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-COO^- \longrightarrow CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O^- + CO_2$
Piruvato → Acetato

**4. Relação entre a liberação de energia e o estado de oxidação do carbono.** Uma célula eucariótica pode utilizar glicose ($C_6H_{12}O_6$) e ácido hexanoico ($C_6H_{14}O_2$) como combustíveis para a respiração celular. Com base nas fórmulas estruturais, qual substância libera mais energia por grama na combustão completa a $CO_2$ e $H_2O$?

**5. Coenzimas de nicotinamida como transportadores redox reversíveis.** As coenzimas de nicotinamida (ver Figura 13-24) podem, com os substratos adequados e na presença da desidrogenase apropriada, sofrer reações reversíveis de oxidação-redução. Nessas reações, NADH + $H^+$ atua como fonte de hidrogênio, como descrito no Problema 3. Sempre que a coenzima for oxidada, o substrato deve ser simultaneamente reduzido:

$$\underset{\text{Oxidado}}{\text{Substrato}} + \underset{\text{Reduzido}}{\text{NADH}} + H^+ \rightleftharpoons \underset{\text{Reduzido}}{\text{produto}} + \underset{\text{Oxidado}}{NAD^+}$$

Para cada uma das reações de (a) a (f), determine se o substrato foi oxidado, reduzido ou se o estado de oxidação não foi alterado (ver Problema 3). Caso uma variação redox tenha ocorrido, equilibre a reação com a quantidade necessária de $NAD^+$, NADH, $H^+$ e $H_2O$. O objetivo é reconhecer quando uma coenzima redox é necessária em uma reação metabólica.

(a) $CH_3CH_2OH \longrightarrow CH_3{-}CHO$

Etanol → Acetaldeído

(b) $CH_2(OPO_3^{2-}){-}CH(OH){-}C(=O)OPO_3^{2-} \longrightarrow CH_2(OPO_3^{2-}){-}CH(OH){-}CHO + HPO_4^{2-}$

1,3-Bifosfoglicerato → Gliceraldeído-3-fosfato

(c) $CH_3{-}CO{-}COO^- \longrightarrow CH_3{-}CHO + CO_2$

Piruvato → Acetaldeído

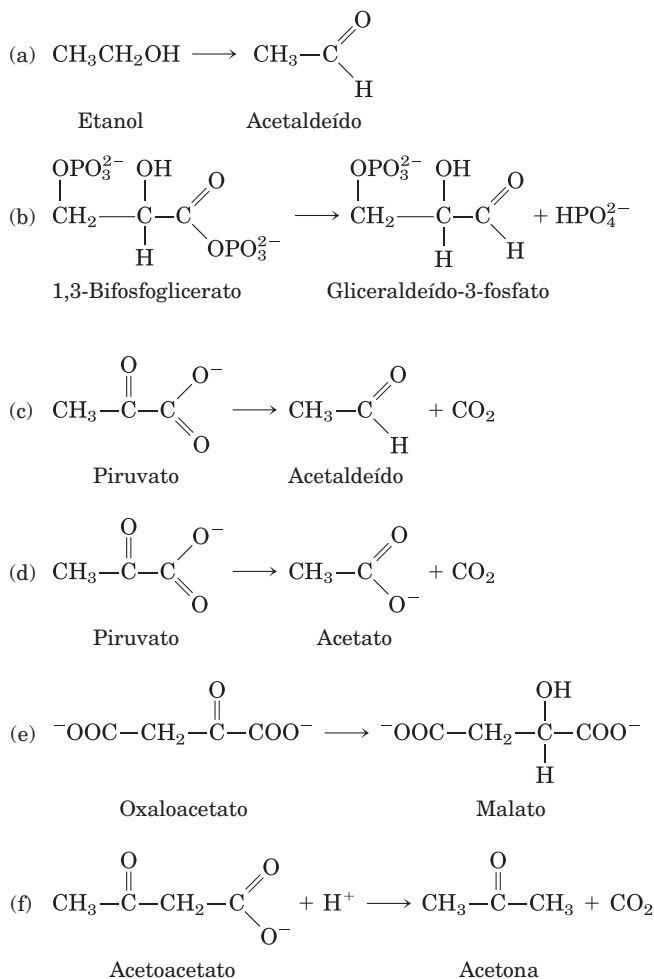
(d) $CH_3{-}CO{-}COO^- \longrightarrow CH_3{-}COO^- + CO_2$

Piruvato → Acetato

(e) $^-OOC{-}CH_2{-}CO{-}COO^- \longrightarrow {}^-OOC{-}CH_2{-}CH(OH){-}COO^-$

Oxaloacetato → Malato

(f) $CH_3{-}CO{-}CH_2{-}COO^- + H^+ \longrightarrow CH_3{-}CO{-}CH_3 + CO_2$

Acetoacetato → Acetona

**6. Cofatores e mecanismo da piruvato-desidrogenase.** Descreva a função de cada cofator envolvido na reação catalisada pelo complexo da piruvato-desidrogenase.

**7. Deficiência de tiamina.** Indivíduos com dieta deficitária em tiamina têm níveis relativamente altos de piruvato na corrente sanguínea. Explique esse fenômeno em termos bioquímicos.

**8. A reação da isocitrato-desidrogenase.** Qual o tipo de reação química envolvido na conversão de isocitrato a $\alpha$-cetoglutarato? Identifique e descreva a função de todos os cofatores. Que outra(s) reação(ões) do ciclo do ácido cítrico é(são) desse mesmo tipo?

**9. Estímulo do consumo de oxigênio por oxaloacetato e malato.** No início dos anos de 1930, Albert Szent-Györgyi publicou a interessante observação de que a adição de pequenas quantidades de oxaloacetato ou malato a suspensões de um macerado do músculo peitoral de pombo estimulava o consumo de oxigênio da preparação. Surpreendentemente, a quantidade de oxigênio consumida era cerca de sete vezes maior do que a quantidade necessária para a oxidação completa (a $CO_2$ e $H_2O$) do oxaloacetato ou malato adicionado. Por que a adição de oxaloacetato ou malato estimula o consumo de oxigênio? Por que a quantidade de oxigênio consumida era tão maior do que a quantidade necessária para oxidar completamente o oxaloacetato ou malato adicionado?

**10. Formação de oxaloacetato na mitocôndria.** Na última reação do ciclo do ácido cítrico, o malato é desidrogenado para regenerar o oxaloacetato, necessário para a entrada de acetil-CoA no ciclo:

$$\text{L-Malato} + NAD^+ \longrightarrow \text{oxaloacetato} + NADH + H^+ \qquad \Delta G'^\circ = 30{,}0 \text{ kJ/mol}$$

(a) Calcule a constante de equilíbrio a 25°C para esta reação.

(b) Como o $\Delta G'^\circ$ assume um pH padrão igual a 7, a constante de equilíbrio calculada em (a) corresponde a

$$K'_{eq} = \frac{[\text{oxaloacetato}][\text{NADH}]}{[\text{L-malato}][NAD^+]}$$

A medida da concentração de L-malato nas mitocôndrias de fígado de rato é aproximadamente 0,20 mM quando $[NAD^+]/[NADH]$ é igual a 10. Calcule a concentração de oxaloacetato nessas mitocôndrias em pH 7.

(c) Para estimar a magnitude da concentração mitocondrial de oxaloacetato, calcule o número de moléculas de oxaloacetato em uma única mitocôndria do fígado de rato. Assuma que a mitocôndria é uma esfera com 2,0 $\mu$m de diâmetro.

**11. Cofatores do ciclo do ácido cítrico.** Suponha que você tenha preparado um extrato mitocondrial que contém todas as enzimas solúveis da matriz, mas que perdeu (por diálise) todos os cofatores de baixa massa molecular. O que você deve adicionar ao extrato para que a preparação oxide acetil-CoA a $CO_2$?

**12. Deficiência de riboflavina.** Como uma deficiência de riboflavina afetaria o funcionamento do ciclo do ácido cítrico? Explique sua resposta.

**13. Conteúdo de oxaloacetato.** Que fatores poderiam diminuir a quantidade de oxaloacetato disponível para a atividade do ciclo do ácido cítrico? Como o oxaloacetato pode ser reposto?

**14. Rendimento energético do ciclo do ácido cítrico.** A reação catalisada pela succinil-CoA-sintetase produz o composto de alta energia GTP. Como a energia livre contida no GTP é incorporada ao conteúdo celular de ATP?

**15. Estudos sobre respiração em mitocôndrias isoladas.** A respiração celular pode ser estudada em mitocôndrias isoladas pela medida do consumo de oxigênio sob diferentes condições. Se 0,01 M de malonato de sódio é adicionado a mitocôndrias respirando ativamente e utilizando piruvato como fonte de combustível, a respiração rapidamente para e um intermediário metabólico se acumula.

(a) Qual é a estrutura desse intermediário?

(b) Explique por que ele se acumula.

(c) Explique por que o consumo de oxigênio para.

(d) Além da remoção do malonato, como essa inibição da respiração pode ser superada? Explique.

**16. Estudos com marcação em mitocôndrias isoladas.** As vias metabólicas dos compostos orgânicos têm sido frequentemente delineadas pelo uso de um substrato marcado radioativamente com o posterior acompanhamento do destino desse marcador.

(a) Como você poderia determinar se a glicose adicionada a uma suspensão de mitocôndrias isoladas é metabolizada a $CO_2$ e $H_2O$?

(b) Suponha que você adicione um breve pulso de [3-$^{14}$C] piruvato (marcado na posição do metil) às mitocôndrias. Após uma rodada do ciclo do ácido cítrico, qual é a posição do $^{14}$C no oxaloacetato? Explique seguindo o marcador $^{14}$C ao longo da via. Quantas rodadas do ciclo são necessárias para que todo o [3-$^{14}$C]piruvato seja liberado na forma de $CO_2$?

**17. A via do $CO_2$ na gliconeogênese.** Na primeira etapa da gliconeogênese, a conversão de piruvato a fosfoenolpiruvato (PEP), o piruvato é carboxilado pela piruvato-carboxilase a oxaloacetato, depois descarboxilado a PEP pela PEP-carboxicinase (Capítulo 14). Como a adição de $CO_2$ é seguida pela perda de $CO_2$, você poderia esperar que, em experimentos com marcadores, o $^{14}$C do $^{14}CO_2$ não fosse incorporado ao PEP, glicose ou qualquer outro intermediário da gliconeogênese. Entretanto, pesquisadores observaram que, quando uma preparação de fígado de rato sintetiza glicose na presença de $^{14}CO_2$, o $^{14}$C lentamente aparece no PEP e, no devido tempo, aparece no C-3 e no C-4 da glicose. Como o marcador $^{14}$C é incorporado ao PEP e à glicose? (Dica: Durante a gliconeogênese na presença de $^{14}CO_2$, vários intermediários do ciclo do ácido cítrico com quatro carbonos também se tornam marcados.)

**18. Catabolismo da [1-$^{14}$C]glicose.** Uma cultura bacteriana respirando ativamente é incubada brevemente com [1-$^{14}$C] glicose, e os intermediários do ciclo do ácido cítrico e da via glicolítica são isolados. Em que posição está o $^{14}$C em cada um dos intermediários listados abaixo? Considere apenas a incorporação inicial de $^{14}$C, na primeira passagem da glicose marcada pelas vias.

(a) Frutose-1,6-bifosfato

(b) Gliceraldeído-3-fosfato

(c) Fosfoenolpiruvato

(d) Acetil-CoA

(e) Citrato

(f) $\alpha$-Cetoglutarato

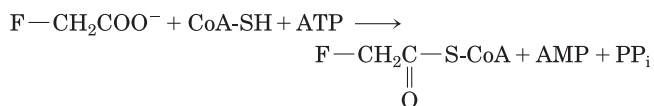
(g) Oxaloacetato

**19. O papel da vitamina tiamina.** Pessoas com beri béri, doença causada pela deficiência de tiamina, apresentam níveis sanguíneos elevados de piruvato e $\alpha$-cetoglutarato, especialmente após consumirem uma refeição rica em glicose. Como esses resultados se relacionam à deficiência de tiamina?

**20. A síntese de oxaloacetato pelo ciclo do ácido cítrico.** O oxaloacetato é formado na última etapa do ciclo do ácido cítrico pela oxidação do L-malato, dependente de $NAD^+$. A síntese líquida de oxaloacetato a partir de acetil-CoA poderia ocorrer com o uso somente de enzimas e cofatores do ciclo do ácido cítrico, sem o esgotamento dos intermediários do ciclo? Explique. Como o oxaloacetato que é desviado do ciclo (para reações biossintéticas) é reposto?

**21. O esgotamento de oxaloacetato.** O fígado de mamíferos pode efetuar a gliconeogênese utilizando oxaloacetato como material de partida (Capítulo 14). A operação do ciclo do ácido cítrico seria afetada pela intensa utilização de oxaloacetato para a gliconeogênese? Explique sua resposta.

**22. O modo de ação do rodenticida fluoroacetato.** O fluoroacetato, comercialmente preparado para o controle de roedores, também é produzido por uma planta sul-africana. Após entrar na célula, o fluoroacetato é convertido a fluoroacetil-CoA em uma reação catalisada pela enzima acetato-tiocinase:

$$F{-}CH_2COO^- + \text{CoA-SH} + \text{ATP} \longrightarrow F{-}CH_2\underset{\underset{\displaystyle O}{\|}}{C}{-}\text{S-CoA} + \text{AMP} + PP_i$$

O efeito tóxico do fluoroacetato foi estudado em um experimento utilizando o coração isolado e intacto de rato. Após o coração ser perfundido com fluoroacetato 0,22 mM, as taxas medidas de captação de glicose e a glicólise diminuíram, e glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato ficaram acumuladas. O exame dos intermediários do ciclo do ácido cítrico revelou que essas concentrações estavam abaixo do normal, exceto pelo citrato, com uma concentração 10 vezes maior do que o normal.

(a) Onde ocorreu o bloqueio do ciclo do ácido cítrico? O que causou o acúmulo de citrato e o esgotamento dos outros intermediários?

(b) A fluoroacetil-CoA é enzimaticamente transformada pelo ciclo do ácido cítrico. Qual é a estrutura do produto final do metabolismo do fluoroacetato? Por que ele bloqueia o ciclo do ácido cítrico? Como a inibição pode ser superada?

(c) Nos experimentos de perfusão cardíaca, por que a captação de glicose e a glicólise diminuíram? Por que as hexoses monofosfatadas se acumularam?

(d) Por que o fluoroacetato é um veneno letal?

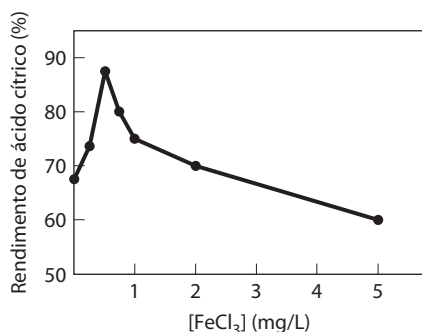
**23. A síntese de L-malato na produção de vinho.** A acidez de alguns vinhos é devida às altas concentrações de L-malato. Escreva uma sequência de reações mostrando como células de leveduras sintetizam L-malato a partir de glicose sob condições anaeróbias na presença de $CO_2$ dissolvido ($HCO_3^-$). Observe que a reação global dessa fermentação não pode envolver o consumo de coenzimas de nicotinamida ou intermediários do ciclo do ácido cítrico.

**24. Síntese líquida de $\alpha$-cetoglutarato.** O $\alpha$-cetoglutarato desempenha um papel crucial na biossíntese de alguns aminoácidos. Escreva a sequência de reações enzimáticas que poderiam resultar na síntese líquida de $\alpha$-cetoglutarato a partir de piruvato. A sequência de reações proposta não deve envolver o consumo líquido de outros intermediários do ciclo do ácido cítrico. Escreva uma equação para a reação global e identifique a fonte de cada reagente.

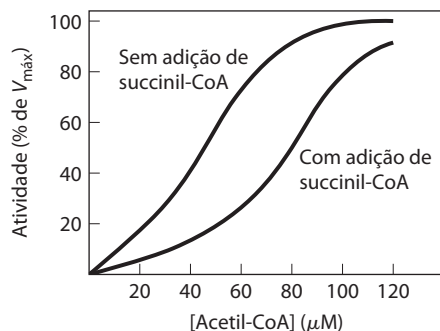
**25. Vias anfibólicas.** Explique, dando exemplos, o significado da afirmação de que o ciclo do ácido cítrico é anfibólico.

**26. Regulação do complexo da piruvato-desidrogenase.** Nos tecidos animais, a taxa de conversão de piruvato a acetil--CoA é regulada pela razão entre o complexo da PDH ativo e fosforilado, e inativo e desfosforilado. Determine o que acontece com a velocidade desta reação quando uma preparação de mitocôndrias de músculo de coelho contendo o complexo da PDH é tratada com (a) piruvato-desidrogenase-cinase, ATP e NADH; (b) piruvato-desidrogenase-fosfatase e $Ca^{2+}$; (c) malonato.

**27. A síntese comercial de ácido cítrico.** O ácido cítrico é utilizado como agente flavorizante em refrigerantes, sucos de frutas e em muitos outros alimentos. Ao redor do mundo, o mercado do ácido cítrico está estimado em centenas de milhões de dólares por ano. A produção comercial utiliza o fungo *Aspergillus niger*, que metaboliza a sacarose sob condições cuidadosamente controladas.

(a) O rendimento de ácido cítrico depende muito da concentração de $FeCl_3$ no meio de cultura, como indicado no gráfico. Por que o rendimento decresce quando a concentração de $Fe^{3+}$ está acima ou abaixo do valor ótimo de 0,5 mg/L?

(b) Escreva a sequência de reações pelas quais *A. niger* sintetiza ácido cítrico a partir de sacarose. Escreva uma equação para a reação global.

(c) O processo comercial requer que o meio de cultura seja aerado? Em outras palavras, o processo é uma fermentação ou um processo aeróbio? Explique.

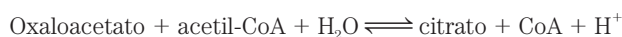
**28. Regulação da citrato-sintase.** Na presença de quantidades saturantes de oxaloacetato, a atividade da citrato-sintase do tecido cardíaco de porco mostra uma dependência sigmoide da concentração de acetil-CoA, como mostrado no gráfico abaixo. Quando succinil-CoA é adicionado, a curva é deslocada para a direita e a dependência sigmoide é mais pronunciada.

Com base nessas observações, sugira como a succinil-CoA regula a atividade da citrato-sintase. (Dica: ver Figura 6-34.) Por que a succinil-CoA é um sinal apropriado para a regulação do ciclo do ácido cítrico? Como a regulação da citrato-sintase controla a taxa de respiração celular no tecido cardíaco de porco?

**29. Regulação da piruvato-carboxilase.** A carboxilação do piruvato pela piruvato-carboxilase ocorre em uma velocidade muito baixa, a não ser que acetil-CoA, um modulador alostérico positivo, esteja presente. Logo após uma refeição rica em ácidos graxos (triacilgliceróis), mas baixa em carboidratos (glicose), como essa propriedade de regulação desativa a oxidação de glicose a $CO_2$ e $H_2O$, mas aumenta a oxidação de acetil-CoA derivada de ácidos graxos?

**30. A relação entre respiração e ciclo do ácido cítrico.** Embora o oxigênio não participe diretamente do ciclo do ácido cítrico, o ciclo somente opera quando $O_2$ está presente. Por quê?

**31. O efeito da [NADH]/[NAD$^+$] sobre o ciclo do ácido. cítrico** Como você espera que a operação do ciclo do ácido cítrico responda a um rápido aumento da razão [NADH]/[NAD$^+$] na matriz mitocondrial? Por quê?

**32. A termodinâmica da reação da citrato-sintase nas células.** O citrato é formado pela condensação de acetil-CoA e oxaloacetato, catalisada pela citrato-sintase:

$$\text{Oxaloacetato} + \text{acetil-CoA} + H_2O \rightleftharpoons \text{citrato} + \text{CoA} + H^+$$

Em mitocôndrias de coração de rato, a pH 7 e 25°C, as concentrações de reagentes e produtos são: oxaloacetato, 1 $\mu$M; acetil-CoA, 1 $\mu$M; citrato, 220 $\mu$M; e CoA, 65 $\mu$M. A variação de energia livre padrão da reação da citrato-sintase é −32,2 kJ/mol. Qual é o sentido do fluxo de metabólitos na reação da citrato-sintase nas células cardíacas de rato? Explique.

**33. As reações do complexo da piruvato-desidrogenase** Duas das etapas da descarboxilação oxidativa do piruvato (etapas ❹ e ❺ na Figura 16-6) não envolvem nenhum dos três carbonos do piruvato, ainda que eles sejam essenciais para o funcionamento do complexo da PDH. Explique.

**34. Mutantes do ciclo do ácido cítrico.** Existem muitos exemplos de doenças humanas nas quais uma ou outra atividade enzimática está ausente devido a mutações genéticas. Entretanto, doenças nas quais indivíduos careçam de uma das enzimas do ciclo do ácido cítrico são extremamente raras. Por quê?

**35. Partição entre os ciclos do ácido cítrico e do glioxilato.** Em um organismo (como *E. coli*) que tem o ciclo do ácido cítrico e o ciclo do glioxilato, o que determina em qual dessas vias o isocitrato entrará?

## Problema de análise de dados

**36. Como o ciclo do ácido cítrico foi determinado.** A bioquímica detalhada do ciclo do ácido cítrico foi determinada por diversos pesquisadores ao longo de décadas. Em um artigo de 1937, Krebs e Johnson resumiram seu trabalho e o trabalho de outros na primeira descrição publicada dessa via.

Os métodos utilizados por esses pesquisadores eram muito diferentes dos da bioquímica moderna. Marcadores radioativos não estavam comumente disponíveis até os anos de 1940, de modo que Krebs e outros pesquisadores tiveram que utilizar técnicas sem marcadores para elucidar a via. Utilizando amostras frescas de músculo peitoral de pombo, eles determinaram o consumo de oxigênio preparando uma suspensão do músculo macerado em tampão em um frasco lacrado, e medindo

o volume (em $\mu$L) de oxigênio consumido sob diferentes condições. Eles mediram os níveis de substratos (intermediários) tratando as amostras com ácido para a remoção das proteínas contaminantes, e a seguir dosaram as quantidades de várias moléculas orgânicas pequenas. As duas observações-chave que levaram Krebs e colaboradores a proporem o *ciclo* do ácido cítrico, em vez de uma *via linear* (como a glicólise), foram feitas nos seguintes experimentos.

*Experimento I*. Eles incubaram 460 mg de músculo macerado em 3 mL de tampão a 40°C por 150 minutos. A adição de *citrato* aumentou o consumo de $O_2$ em 893 $\mu$L em comparação com as amostras sem citrato. Eles calcularam, com base no consumo de $O_2$ durante a respiração de outros compostos contendo carbono, que o consumo de $O_2$ esperado para a respiração completa desta quantidade de citrato seria de apenas 302 $\mu$L.

*Experimento II*. Eles mediram o consumo de $O_2$ por 460 mg de músculo macerado em 3 mL de tampão quando incubado com *citrato* e/ou *1-fosfoglicerol* (glicerol-1-fosfato, o qual sabia-se ser prontamente oxidado pela respiração celular) a 40°C por 140 minutos. Os resultados estão mostrados na tabela.

| Amostra | Substrato(s) adicionado(s) | $\mu$L de $O_2$ absorvidos |
|---|---|---|
| 1 | Sem substrato extra | 342 |
| 2 | 0,3 mL de 0,2 M 1-fosfoglicerol | 757 |
| 3 | 0,15 mL de 0,02 M citrato | 431 |
| 4 | 0,3 mL de 0,2 M 1-fosfoglicerol e 0,15 mL de 0,02 M citrato | 1.385 |

(a) Por que o consumo de $O_2$ é uma boa medida da respiração celular?

(b) Por que a amostra 1 (tecido muscular não suplementado) consome oxigênio?

(c) Com base nos resultados das amostras 2 e 3, você pode concluir que 1-fosfoglicerol e citrato atuam como substratos para a respiração celular neste sistema? Explique seu raciocínio.

(d) Krebs e colaboradores utilizaram estes experimentos para argumentar que o citrato era "catalítico" – isto é, que auxiliava as amostras de tecido muscular a metabolizar o 1-fosfoglicerol de forma mais completa. Como você utilizaria os resultados deles para aprofundar esse argumento?

(e) Krebs e colaboradores também argumentaram que o citrato não era simplesmente consumido, mas deveria ser *regenerado*. Portanto, as reações deveriam formar um *ciclo* em vez de uma via linear. Como você aprofundaria esse argumento?

Outros pesquisadores haviam observado que o *arsenato* ($AsO_4^{-3}$) inibia a $\alpha$-cetoglutarato-desidrogenase e que o *malonato* inibia a succinato-desidrogenase.

(f) Krebs e colaboradores observaram que as amostras de tecido muscular tratadas com arsenato e citrato consumiriam o citrato apenas na presença de oxigênio e, sob essas condições, oxigênio seria consumido. Com base na via da Figura 16-7, a que molécula o citrato era convertido neste experimento, e por que as amostras consumiam oxigênio?

Em seu artigo, Krebs e Johnson também relataram o seguinte. (1) Na presença de arsenato, 5,48 mmol de citrato eram convertidos a 5,07 mmol de $\alpha$-cetoglutarato. (2) Na presença de malonato, o citrato era quantitativamente convertido a grandes quantidades de succinato e pequenas quantidades de $\alpha$-cetoglutarato. (3) A adição de oxaloacetato na ausência de oxigênio levava à produção de uma grande quantidade de citrato; essa quantidade era aumentada quando glicose também fosse adicionada.

Outros pesquisadores haviam descoberto a seguinte rota em preparações similares de tecido muscular:

$$\text{Succinato} \longrightarrow \text{fumarato} \longrightarrow \text{malato} \longrightarrow \text{oxaloacetato} \longrightarrow \text{piruvato}$$

(g) Com base somente nos dados apresentados neste problema, qual é a ordem dos intermediários no ciclo do ácido cítrico? Como isso se compara à Figura 16-7? Explique seu raciocínio.

(h) Por que era importante mostrar a conversão *quantitativa* de citrato a $\alpha$-cetoglutarato?

O artigo de Krebs e Johnson também apresenta outros resultados que elucidaram a maioria dos componentes ausentes do ciclo. O único componente que ficou indeterminado foi a molécula que reage com oxaloacetato para formar citrato.

## Referência

**Krebs, H.A. & Johnson, W.A.** (1937) The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia* **4**, 148–156. (Reimpresso [1980] em *FEBS Lett*. **117** [Suppl.], K2–K10.)

# 17

# Catabolismo de Ácidos Graxos



A oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa à acetil-CoA é uma via central de geração de energia em muitos organismos e tecidos. No coração e no fígado de mamíferos, por exemplo, ela fornece até 80% das necessidades energéticas em todas as circunstâncias fisiológicas. Os elétrons retirados dos ácidos graxos durante a oxidação passam pela cadeia respiratória, levando à síntese de ATP; a acetil-CoA produzida a partir dos ácidos graxos pode ser completamente oxidada a $CO_2$ no ciclo do ácido cítrico, resultando em mais conservação de energia. Em algumas espécies e em alguns tecidos, a acetil-CoA tem destinos alternativos. No fígado, a acetil-CoA pode ser convertida em corpos cetônicos – combustíveis solúveis em água exportados para o cérebro e para outros tecidos quando glicose não está disponível. Em vegetais superiores, a acetil-CoA serve principalmente de precursor biossintético, e apenas secundariamente como combustível. Embora o papel biológico da oxidação dos ácidos graxos varie de acordo com o organismo, o mecanismo é essencialmente o mesmo. O processo repetitivo de quatro etapas, chamado de **$\beta$-oxidação**, por meio do qual os ácidos graxos são convertidos em acetil-CoA é o tópico principal deste capítulo.

No Capítulo 10 foram descritas as propriedades dos triacilgliceróis (também chamados de triglicerídeos ou gorduras neutras) que os tornam especialmente adequados como combustíveis de armazenamento. As cadeias alquilas longas de seus ácidos graxos constituintes são essencialmente hidrocarbonetos, estruturas altamente reduzidas com uma energia de oxidação completa (~38 kJ/g) mais de duas vezes maior que a produzida pelo mesmo peso de carboidratos ou proteínas. Essa vantagem é composta pela extrema insolubilidade dos lipídeos em água; os triacilgliceróis celulares se agregam em gotículas lipídicas, que não aumentam a osmolaridade do citosol e não são solvatadas. (Nos polissacarídeos de armazenamento, ao contrário, a água de solvatação pode ser responsável por dois terços do peso total das moléculas armazenadas.) E devido a sua relativa inércia química, os triacilgliceróis podem ser armazenados em grande quantidade nas células, sem o risco de reações químicas indesejáveis com outros constituintes celulares.

As propriedades que tornam os triacilgliceróis compostos de armazenamento adequados, no entanto, apresentam problemas em seu papel como combustível. Por serem insolúveis em água, os triacilgliceróis ingeridos devem ser emulsificados antes que possam ser digeridos por enzimas hidrossolúveis no intestino, e os triacilgliceróis absorvidos no instestino ou mobilizados dos tecidos de armazenamento devem ser carregados no sangue ligados a proteínas que neutralizam a sua insolubilidade. Para superar a relativa estabilidade das ligações C—C em um ácido graxo, o grupo carboxil do C-1 é ativado pela ligação à coenzima A, que permite a oxidação gradativa do grupo acil graxo na posição C-3, ou $\beta$ – daí o nome $\beta$-oxidação.

Este capítulo inicia com uma breve discussão sobre as fontes de ácidos graxos e sobre as vias pelas quais eles se deslocam até o seu sítio de oxidação, com ênfase especial no processo em vertebrados. Em seguida, descreve as etapas químicas da oxidação dos ácidos graxos nas mitocôndrias. A oxidação completa dos ácidos graxos a $CO_2$ e $H_2O$ ocorre em três etapas: a oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa a fragmentos de dois carbonos, na forma de acetil-CoA ($\beta$-oxidação); a oxidação de acetil-CoA a $CO_2$ no ciclo do ácido cítrico (Capítulo 16); e a transferência de elétrons dos transportadores de elétrons reduzidos à cadeia respiratória mitocondrial (Capítulo 19). Neste capítulo, será apresentada a primeira dessas etapas. A discussão sobre a $\beta$-oxidação inicia com o caso simples no qual um ácido graxo completamente saturado com um número par de átomos de carbono é degradado a acetil-CoA. Então são analisadas brevemente as transformações extras necessárias para a degradação de ácidos graxos insaturados e ácidos graxos com um número ímpar de carbonos. Finalmente, são discutidas as variações sobre o tema da $\beta$-oxidação nas organelas especializadas – peroxissomos e glioxissomos – e duas vias menos comuns do catabolismo de ácidos graxos, as oxidações $\omega$ e $\alpha$. O capítulo é concluído com uma descrição de um destino alternativo para a acetil-CoA formada pela $\beta$-oxidação em vertebrados: a produção de corpos cetônicos no fígado.

## 17.1 Digestão, mobilização e transporte de gorduras

As células podem obter combustíveis de ácidos graxos de três fontes: gorduras consumidas na dieta, gorduras armazenadas nas células como gotículas de lipídeos e gorduras sintetizadas em um órgão para exportação a outro. Algumas espécies utilizam as três fontes sob várias circunstâncias, outras utilizam uma ou duas delas. Os vertebrados, por exemplo, obtêm gorduras na dieta, mobilizam gorduras armazenadas em tecidos especializados (tecido adiposo, consistindo em células chamadas adipócitos) e, no fígado, convertem o excesso dos carboidratos da dieta em gordura para a exportação aos outos tecidos. Em média, 40% ou mais das necessidades energéticas diárias das pessoas que vivem em países altamente industrializados são supridos pelos triacilgliceróis da dieta (embora a maioria das diretrizes nutricionais recomende que o consumo calórico diário de gorduras não ultrapasse 30%). Os triacilgliceróis fornecem mais da metade das necessidades energéticas de alguns órgãos, particularmente o fígado, o coração e a musculatura esquelética em repouso. Os triacilgliceróis armazenados são praticamente a única fonte de energia dos animais hibernantes e das aves migratórias. Os protistas obtêm gorduras consumindo organismos mais abaixo na cadeia alimentar e alguns também armazenam gorduras como gotículas citosólicas de lipídeos. As plantas vasculares mobilizam gorduras armazenadas nas sementes durante a germinação, mas não dependem de gorduras para a obtenção de energia.

### As gorduras da dieta são absorvidas no intestino delgado

Nos vertebrados, antes que os triacilgliceróis possam ser absorvidos através da parede intestinal, eles precisam ser convertidos de partículas de gordura macroscópicas insolúveis em micelas microscópicas finamente dispersas. Essa solubilização é realizada pelos sais biliares, como o ácido taurocólico (p. 370), que são sintetizados a partir do colesterol no fígado, armazenados na vesícula biliar e liberados no intestino delgado após a ingestão de uma refeição gordurosa. Os sais biliares são compostos anfipáticos que atuam como detergentes biológicos, convertendo as gorduras da dieta em micelas mistas de sais biliares e triacilgliceróis (**Figura 17-1**, etapa ❶). A formação de micelas aumenta muito a fração das moléculas de lipídeo acessíveis à ação das lipases hidrossolúveis no intestino, e a ação das lipases converte os triacilgliceróis em monoacilgliceróis (monoglicerídeos) e diacilgliceróis (diglicerídeos), ácidos graxos livres e glicerol (etapa ❷). Esses produtos da ação da lipase se difundem para dentro das células epiteliais que revestem a superfície intestinal (a mucosa intestinal) (etapa ❸),

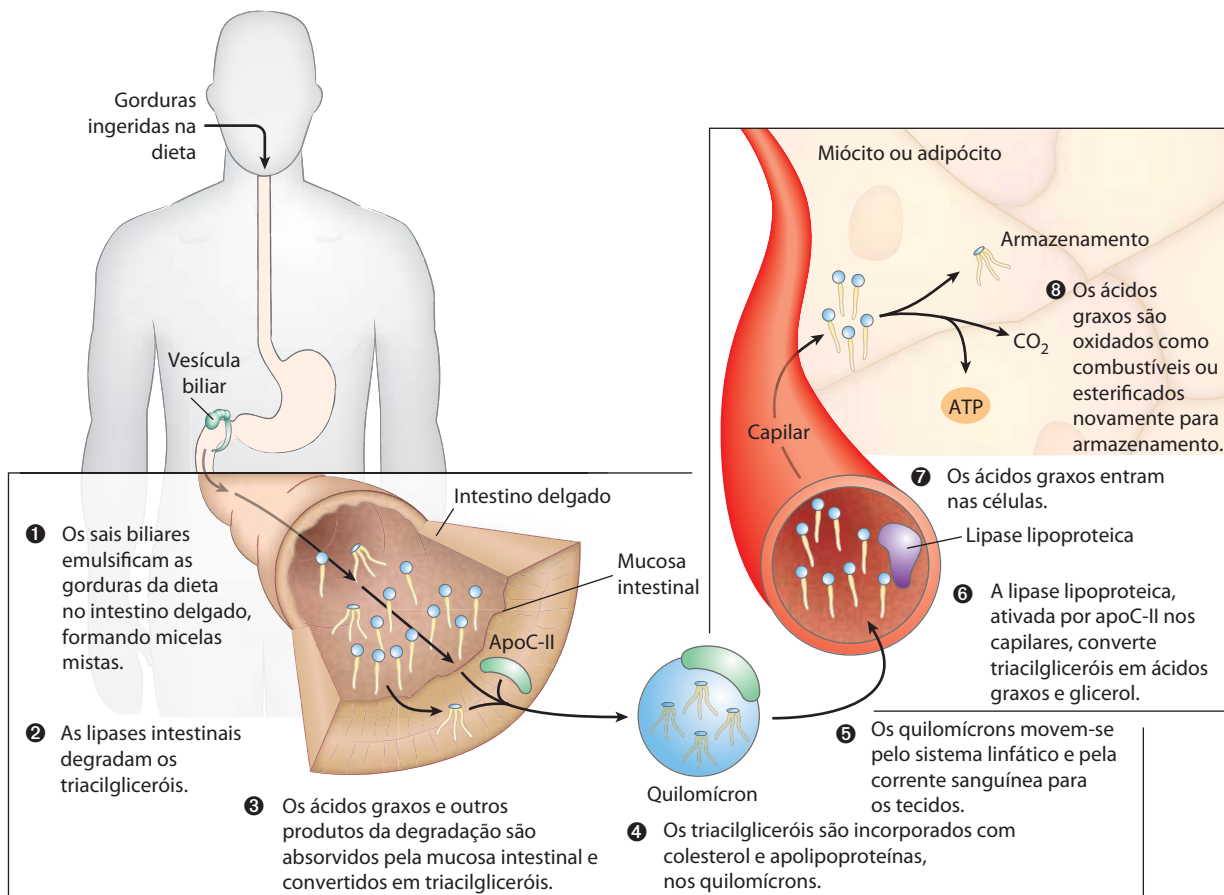



**FIGURA 17-1 O processamento dos lipídeos da dieta em vertebrados.** A digestão e a absorção dos lipídeos da dieta ocorrem no intestino delgado, e os ácidos graxos liberados dos triacilgliceróis são empacotados e distribuídos para os músculos e o tecido adiposo. Os oito passos são discutidos no texto.

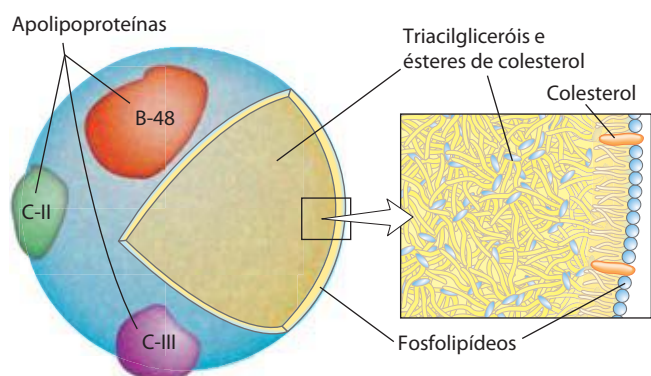



**FIGURA 17-2** **Estrutura molecular de um quilomícron.** A superfície é formada por uma camada de fosfolipídeos, com os grupos polares em contato com a fase aquosa. Os triacilgliceróis sequestrados no interior (em amarelo) representam mais de 80% da massa do quilomícron. Várias apolipoproteínas que se projetam da superfície (B-48, C-III, C-II) atuam como sinalizadores na absorção e no metabolismo do conteúdo dos quilomícrons. O diâmetro dos quilomícrons varia de aproximadamente 100 a 500 nm.

onde são reconvertidos em triacilgliceróis e empacotados com o colesterol da dieta e proteínas específicas em agregados de lipoproteínas chamados **quilomícrons** (**Figura 17-2**; ver também a Figura 17-1, etapa ❹).

As **apolipoproteínas** são proteínas de ligação a lipídeos no sangue, responsáveis pelo transporte de triacilgliceróis, fosfolipídeos, colesterol e ésteres de colesterol entre os órgãos. As apolipoproteínas ("apo" significa "destacado" ou "separado", designando a proteína em sua forma livre de lipídeos) se combinam com os lipídeos para formar várias classes de partículas de **lipoproteína**, que são agregados esféricos com lipídeos hidrofóbicos no centro e cadeias laterais hidrofílicas de proteínas e grupos polares de lipídeos na superfície. Várias combinações de lipídeos e proteínas produzem partículas de densidades diferentes, variando de quilomícrons e lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL, de *very low density lipoproteins*) a lipoproteínas de densidade muito alta (VHDL, de *very high density lipoproteins*), que podem ser separadas por ultracentrifugação. As estruturas dessas partículas de lipoproteínas e seus papéis no transporte de lipídeos estão detalhadas no Capítulo 21.

As porções proteicas das lipoproteínas são reconhecidas por receptores nas superfícies celulares. Na absorção de lipídeos no intestino, os quilomícrons, que contêm a apolipoproteína C-II (apoC-II), se deslocam da mucosa intestinal para o sistema linfático e então entram no sangue, que os carrega para os músculos e o tecido adiposo (Figura 17-1, etapa ❺). Nos capilares desses tecidos, a enzima extracelular **lipase lipoproteica**, ativada pela apoC-II, hidrolisa os triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol (etapa ❻), absorvidos pelas células nos tecidos-alvo (etapa ❼). No músculo, os ácidos graxos são oxidados para obter energia; no tecido adiposo, eles são reesterificados para armazenamento na forma de triacilgliceróis (etapa ❽).

Os remanescentes dos quilomícrons, desprovidos da maioria dos seus triacilgliceróis, mas ainda contendo colesterol e apolipoproteínas, se deslocam pelo sangue até o fígado, onde são captados por endocitose mediada pelos receptores específicos para as suas respectivas apolipoproteínas. Os triacilgliceróis que entram no fígado por essa via podem ser oxidados para fornecer energia ou precursores para a síntese de corpos cetônicos, como descrito na Seção 17.3. Quando a dieta contém mais ácidos graxos do que o necessário imediatamente como combustível ou como precursores, o fígado os converte em triacilgliceróis, empacotados com apolipoproteínas específicas formando VLDL. As VLDL são transportadas pelo sangue até o tecido adiposo, onde os triacilgliceróis são removidos da circulação e armazenados em gotículas lipídicas dentro dos adipócitos.

## Hormônios ativam a mobilização dos triacilgliceróis armazenados

Os lipídeos neutros são armazenados nos adipócitos (e nas células que sintetizam esteroides do córtex da suprarrenal, dos ovários e dos testículos) na forma de gotículas lipídicas, com um centro de ésteres de esteróis e triacilgliceróis envoltos por uma monocamada de fosfolipídeos. A superfície dessas gotículas é revestidas por **perilipinas**, família de proteínas que restringem o acesso às gotículas lipídicas, evitando a mobilização prematura dos lipídeos. Quando hormônios sinalizam a necessidade de energia metabólica, os triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo são mobilizados (retirados do armazenamento) e transportados aos tecidos (musculatura esquelética, coração e córtex renal) nos quais os ácidos graxos podem ser oxidados para a produção de energia. Os hormônios adrenalina e glucagon, secretados em resposta aos baixos níveis de glicose ou atividade iminente, estimulam a enzima adenilil ciclase na membrana plasmática dos adipócitos (**Figura 17-3**), que produz o segundo mensageiro intracelular AMP cíclico (cAMP; ver Figura 12-4). A proteína-cinase dependente de cAMP (PKA) leva à mudanças que abrem a gotícula de lipídeo para a atividade de três lipases, que atuam sobre tri-, di- e monoacilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol.

Os ácidos graxos assim liberados (**ácidos graxos livres, FFA**, de *free fatty acids*) passam dos adipócitos para o sangue, onde eles se ligam à **albumina sérica** (Figura 17-3). Essa proteína ($M_r$ 66.000), que representa cerca da metade da proteína sérica total, se liga não covalentemente a até 10 ácidos graxos por monômero de proteína. Ligados a essa proteína solúvel, os ácidos graxos que de outra maneira seriam insolúveis, são transportados aos tecido como o músculo esquelético, o coração e o córtex renal. Nesses tecidos-alvo, os ácidos graxos se dissociam da albumina e são levados por transportadores da membrana plasmática para dentro das células para servir de combustível. O glicerol liberado pela ação da lipase é fosforilado e oxidado a di-hidroxiacetona fosfato, que pode entrar nas vias glicolítica ou gliconeogênica. Alternativamente, o glicerol fosfato pode ser usado na síntese de triacilgliceróis ou de fosfolipídeos.

Cerca de 95% da energia biologicamente disponível dos triacilgliceróis residem nas suas três cadeias longas de ácidos graxos; apenas 5% são fornecidos pela porção glicerol. O glicerol liberado pela ação da lipase é fosforilado

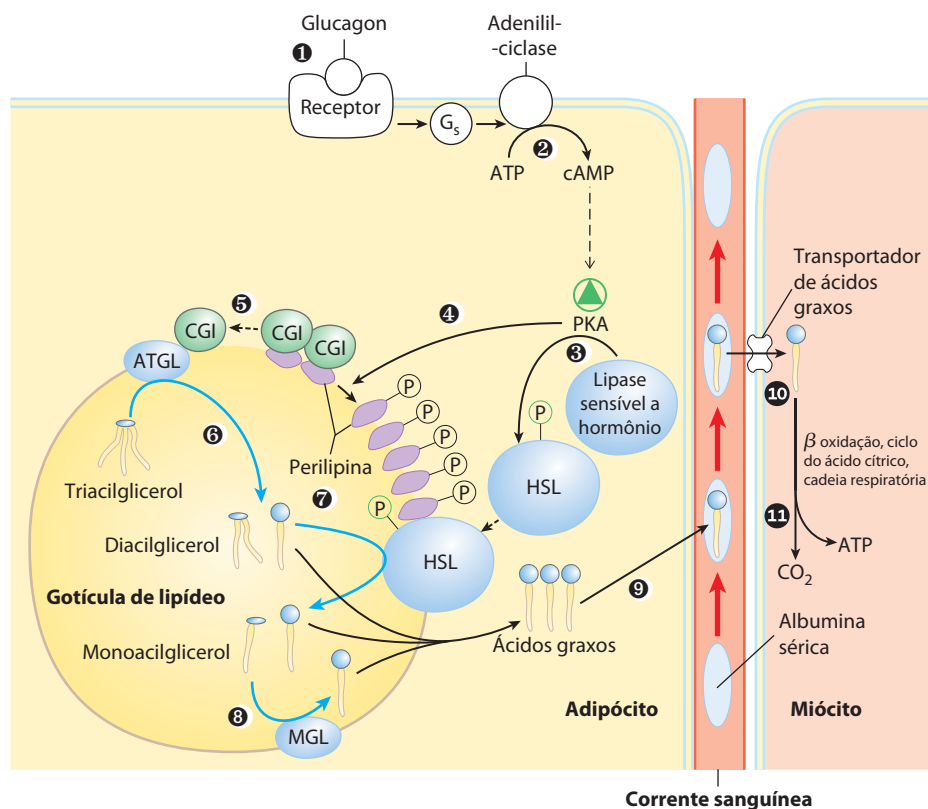



**FIGURA 17-3 Mobilização dos triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo.** Quando os baixos níveis de glicose no sangue ativam a liberação de glucagon, ❶ o hormônio se liga ao seu receptor na membrana do adipócito e assim ❷ estimula a adenilil-ciclase, via uma proteína G, a produzir cAMP. Isso ativa a PKA, que fosforila ❸ a lipase sensível a hormônio (HSL, de *hormone-sensitive lipase*) e ❹ as moléculas de perilipina na superfície da gotícula lipídica. A fosforilação da perilipina causa a ❺ dissociação da proteína CGI da perilipina. A CGI então se associa com a enzima triacilglicerol lipase no adipócito (ATGL, de *adipose triacylglycerol lipase*), ativando-a. A triacilglicerol lipase ativada ❻ converte triacilgliceróis em diacilgliceróis. A perilipina fosforilada se associa com a lipase sensível a hormônios fosforilada, permitindo o acesso à superfície da gotícula lipídica, onde ❼ ela hidrolisa os diacilgliceróis em monoacilgliceróis. Uma terceira lipase, a monoacilglicerol lipase (MGL, de *monoacylglycerol lipase*) ❽ hidrolisa os monoacilgliceróis. ❾ Os ácidos graxos saem do adipócito, se ligam à albumina sérica no sangue e são transportados no sangue; eles são liberados da albumina e ❿ entram em um miócito por meio de um transportador específico de ácidos graxos. ⓫ No miócito, os ácidos graxos são oxidados a $CO_2$, e a energia da oxidação é conservada em ATP, que abastece a contração muscular e outros tipos de metabolismo que necessitam de energia no miócito.

pela **glicerol-cinase** (**Figura 17-4**), e o glicerol-3-fosfato resultante é oxidado a di-hidroxiacetona fosfato. A enzima glicolítica triose-fosfato-isomerase converte esse composto em gliceraldeído-3-fosfato, que é oxidado na glicólise.

## Os ácidos graxos são ativados e transportados para dentro das mitocôndrias

As enzimas da oxidação de ácidos graxos nas células animais estão localizadas na matriz mitocondrial, como demonstrado em 1948 por Eugene P. Kennedy e Albert Lehninger. Os ácidos graxos com comprimento de cadeia de 12 carbonos ou menos entram na mitocôndria sem a ajuda de transportadores de membrana. Aqueles com 14 carbonos ou mais, que constituem a maioria dos ácidos graxos livres obtidos na dieta ou liberados do tecido adiposo, não conseguem passar livremente através das membranas mitocondriais – primeiro eles precisam passar pelas três reações enzimáticas do **ciclo da carnitina**. A primeira reação é catalisada por uma família de isoenzimas (isoenzimas diferentes, específicas para ácidos graxos de cadeia carbonada curta, intermediária ou longa) presente na membrana mitocondrial externa, as **acil-CoA-sintetases**, que catalisam a reação geral

$$\text{Ácido graxo} + \text{CoA} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{acil-CoA graxo} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

Assim, as acil-CoA-sintetases catalisam a formação de uma ligação tioéster entre o grupo carboxil do ácido graxo e o grupo tiol da coenzima A para produzir um **acil-CoA graxo**, acoplado à clivagem do ATP em AMP e $PP_i$. (Lembre-se da descrição dessa reação no Capítulo 13, para ilustrar como a energia livre liberada pela clivagem das ligações fosfoanidrido do ATP pode ser acoplada à formação de um composto de alta energia; p. 524.) A reação ocorre em dois passos e envolve um intermediário acil-graxo-adenilato (**Figura 17-5**).

As acil-graxos-CoA, como a acetil-CoA, são compostos de alta energia; a sua hidrólise a ácidos graxos livres e CoA tem uma grande variação negativa de energia livre padrão ($\Delta G'^{\circ} = -31$ kJ/mol). A formação de uma acil-CoA graxo torna-se favorável pela hidrólise de *duas* ligações de alta energia do ATP; o pirofosfato formado na reação de ativação é imediatamente hidrolisado pela pirofosfatase inorgânica (lado esquerdo da Figura 17-5), que puxa a reação de

Glicerol

Glicerol-cinase: ATP → ADP

L-Glicerol-3-fosfato

Glicerol-3-fosfato-desidrogenase: $NAD^+$ → NADH + $H^+$

Di-hidroxiacetona-fosfato

Triose-fosfato-isomerase

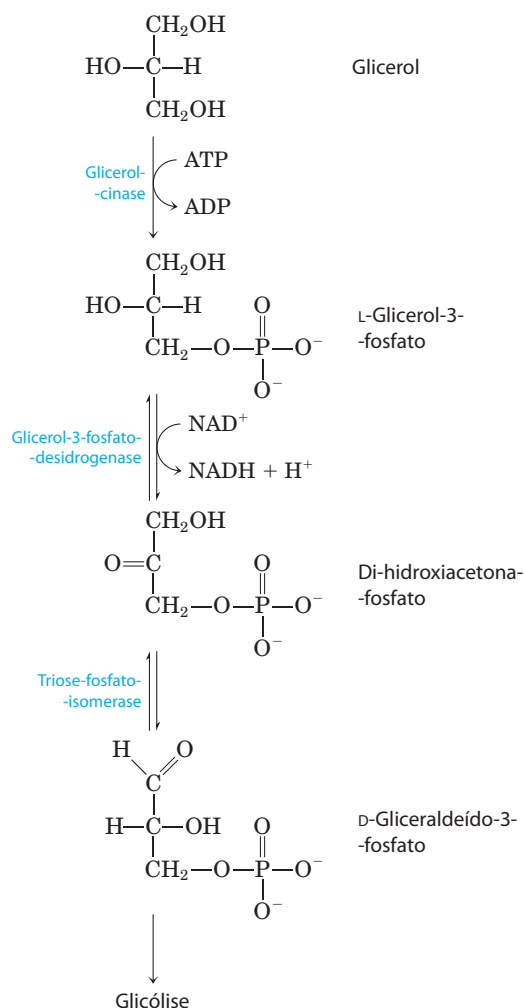
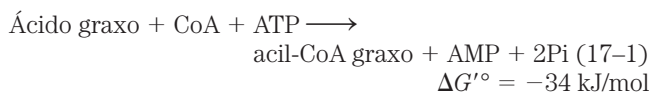
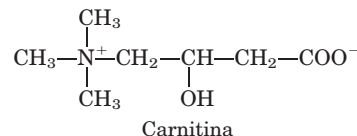
D-Gliceraldeído-3-fosfato

Glicólise

**FIGURA 17-4 A entrada do glicerol na via glicolítica.**

ativação precedente no sentido da formação de acil-CoA graxo. A reação total é

$$\text{Ácido graxo} + \text{CoA} + \text{ATP} \longrightarrow \text{acil-CoA graxo} + \text{AMP} + 2\text{Pi} \quad (17\text{–}1)$$
$$\Delta G'^{\circ} = -34 \text{ kJ/mol}$$

Os ésteres de acil-CoA graxo formados no lado citosólico da membrana externa da mitocôndria podem ser transportados para dentro da mitocôndria e oxidados para produzir ATP, ou podem ser utilizados no citosol para sintetizar lipídeos de membrana. Os ácidos graxos destinados a oxidação mitocondrial estão transitoriamente ligados ao grupo hidroxil da **carnitina**, formando acil-graxo-carnitina – a segunda reação do ciclo.

$$CH_3{-}\overset{CH_3}{\underset{CH_3}{N^+}}{-}CH_2{-}\underset{OH}{CH}{-}CH_2{-}COO^-$$

Carnitina

Essa transesterificação é catalisada pela **carnitina aciltransferase I**, na membrana externa. Ou a acil-CoA passa através da membrana externa e é convertida no éster de carnitina no espaço intermembrana (**Figura 17-6**), ou o éster de carnitina é formado na face citosólica da membrana externa, e então deslocado através da membrana externa para o espaço intermembrana – as evidências atuais não revelam. Em qualquer um dos casos, a passagem para o espaço intermembrana (o espaço entre a membrana externa e a interna) ocorre por meio de grandes poros (formados pela proteína porina) na membrana externa. O éster de acil-graxo-carnitina então entra na matriz por difusão facilitada através do **transportador acil-carnitina/carnitina** da membrana mitocondrial interna (Figura 17-6).

No terceiro e último passo do circuito da carnitina, o grupo acil-graxo é enzimaticamente transferido da carnitina para a conezima A intramitocondrial pela **carnitina-aciltransferase II**. Essa isoenzima, localizada na face citosólica da membrana mitocondrial interna, regenera a acil-CoA graxo e a libera, juntamente com a carnitina livre, dentro da matriz (Figura 17-6). A carnitina retorna ao espaço intermembrana por meio do transportador acil-carnitina/carnitina.

ATP

Ácido graxo

Acil-CoA graxo-sintetase

1 O íon carboxilato é adenilado pelo ATP, para formar um acil-adenilato-graxo e $PP_i$. O $PP_i$ é imediatamente hidrolisado a duas moléculas de $P_i$.

Pirofosfato + Acil-adenilato-graxo (ligado à enzima)

CoA-SH

Pirofosfatase inorgânica → $2P_i$

Acil-CoA graxo-sintetase → AMP

2 O grupo tiol da coenzima A ataca o acil-adenilato (anidrido misto), deslocando o AMP e formando o tioéster acil-CoA graxo.

Acil-CoA graxo (R–C(=O)–S-CoA)

$\Delta G'^{\circ} = -19$ kJ/mol

$\Delta G'^{\circ} = -15$ kJ/mol (para o processo de dois passos)

**MECANISMO-FIGURA 17-5 Conversão de um ácido graxo em uma acil-CoA graxo.** A conversão é catalisada pela acil-CoA graxo-sintetase e pela pirofosfatase inorgânica. A ativação dos ácidos graxos pela formação do derivado de acil-CoA graxo ocorre em duas etapas. A reação total é altamente exergônica. **Mecanismo de acil-CoA graxo-sintetase.**

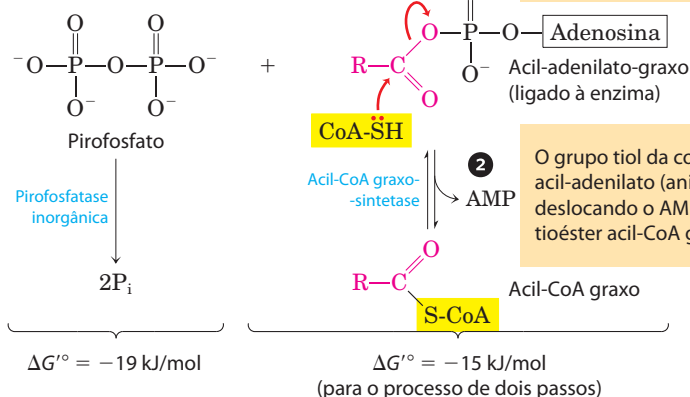
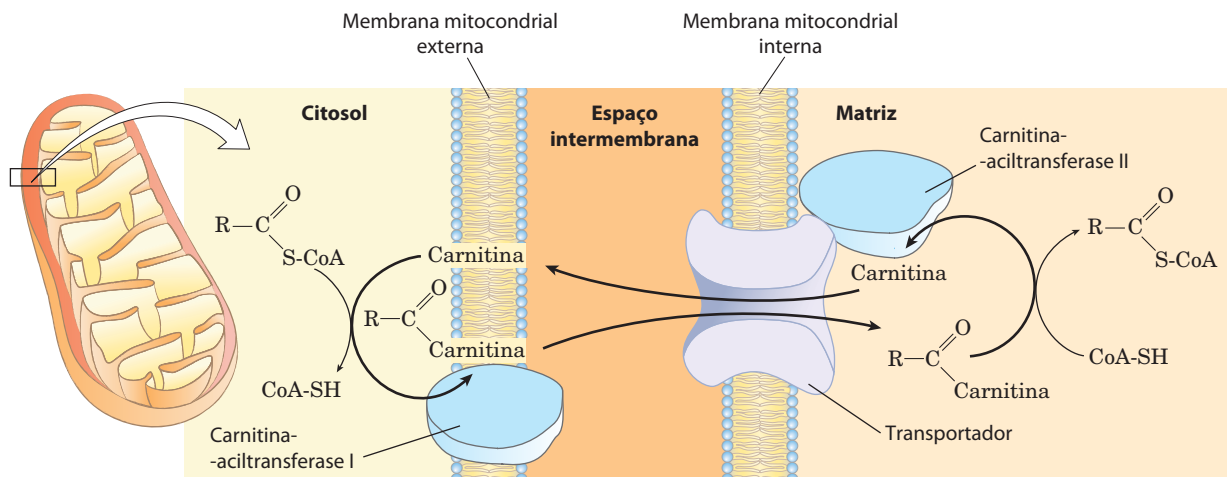



**FIGURA 17-6 Entrada de ácido graxo na mitocôndria pelo transportador acil-carnitina/carnitina.** Após a formação da acil-carnitina-graxo na membrana externa ou no espaço intermembrana, ela se desloca para a matriz pela difusão facilitada por meio do transportador na membrana interna. Na matriz, o grupo acila é transferido para a coenzima A mitocondrial, tornando a carnitina livre para retornar ao espaço intermembrana pelo mesmo transportador. A aciltransferase I é inibida por malonil-CoA, o primeiro intermediário na síntese de ácidos graxos (ver Figura 21-2). Essa inibição evita a síntese e a degradação simultâneas dos ácidos graxos.

Esse processo de três passos para transferir os ácidos graxos para dentro da mitocôndria – esterificação com CoA, transesterificação com carnitina, seguida de transporte e transesterificação de volta a CoA – liga dois reservatórios de coenzima A e de acil-CoA graxo, um no citosol e o outro na mitocôndria. Esses reservatórios têm funções diferentes. A coenzima A na matriz mitocondrial é amplamente utilizada na degradação oxidativa do piruvato, dos ácidos graxos e de alguns aminoácidos, enquanto a coenzima A citosólica é utilizada na biossíntese de ácidos graxos (ver Figura 21-10). A acil-CoA graxo no reservatório citosólico pode ser utilizada para síntese de lipídeos de membrana ou pode ser transportada para dentro da matriz mitocondrial para oxidação e produção de ATP. A conversão ao éster de carnitina compromete a porção acil-graxo com o destino oxidativo.

O processo de entrada mediado pela carnitina é o passo limitante para a oxidação dos ácidos graxos na mitocôndria e, como discutido mais adiante, é um ponto de regulação. Uma vez dentro da mitocôndria, a acil-CoA graxo sofre os efeitos de um conjunto de enzimas da matriz.

## RESUMO 17.1 Digestão, mobilização e transporte de gorduras

- Os ácidos graxos dos triacilgliceróis fornecem uma grande fração da energia oxidativa nos animais. Os triacilgliceróis da dieta são emulsificados no intestino delgado por sais biliares, hidrolisados pelas lipases intestinais, absorvidos pelas células epiteliais intestinais, reconvertidos em triacilgliceróis, e então transformados em quilimícrons pela combinação com apolipoproteínas específicas.
- Os quilomícrons distribuem os triacilgliceróis aos tecidos, onde a lipase lipoproteica libera ácidos graxos livres para a entrada nas células. Os triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo são mobilizados por uma lipase de triacilglicerol sensível a hormônio. Os ácidos graxos liberados se ligam à albumina sérica e são transportados no sangue para o coração, para musculatura esquelética e outros tecidos que utilizam ácidos graxos como combustíveis.
- Uma vez dentro das células, os ácidos graxos são ativados na membrana mitocondrial externa pela conversão em tioésteres de acil-CoA graxos. A acil-CoA graxo que será oxidada entra na mitocôndria em três passos, pelo ciclo da carnitina.

## 17.2 Oxidação de ácidos graxos

Conforme observado anteriormente, a oxidação mitocondrial dos ácidos graxos ocorre em três etapas (**Figura 17-7**). Na primeira etapa – $\beta$-oxidação –, os ácidos graxos sofrem remoção oxidativa de sucessivas unidades de dois carbonos na forma de acetil-CoA, começando pela extremidade carboxílica da cadeia acil-graxo. Por exemplo, o ácido palmítico de 16 carbonos (palmitato em pH 7) passa sete vezes pela sequência oxidativa, perdendo dois carbonos como acetil-CoA em cada passagem. Ao final de sete ciclos, os dois últimos carbonos do palmitato (originalmente C-15 e C-16) permanecem como acetil-CoA. O resultado global é a conversão da cadeia de 16 carbonos do palmitato em oito grupos acetil de dois carbonos das moléculas de acetil-CoA. A formação de cada acetil-CoA requer a remoção de quatro átomos de hidrogênio (dois pares de elétrons e quatro $H^+$) da porção acil-graxo pelas desidrogenases.

Na segunda etapa da oxidação de ácidos graxos, os grupos acetil da acetil-CoA são oxidados a $CO_2$ no ciclo do ácido cítrico, que também ocorre na matriz mitocondrial. A acetil--CoA derivada dos ácidos graxos então entra em uma via de oxidação final comum com a acetil-CoA derivada da glicose precedente da glicólise e da oxidação do piruvato (ver Figura 16-1). As duas primeiras etapas da oxidação dos ácidos graxos produzem os transportadores de elétrons reduzidos NADH e $FADH_2$, que na terceira etapa doam elétrons para a cadeia respiratória mitocondrial, por meio da qual os elétrons passam para o oxigênio com a fosforilação concomitan-

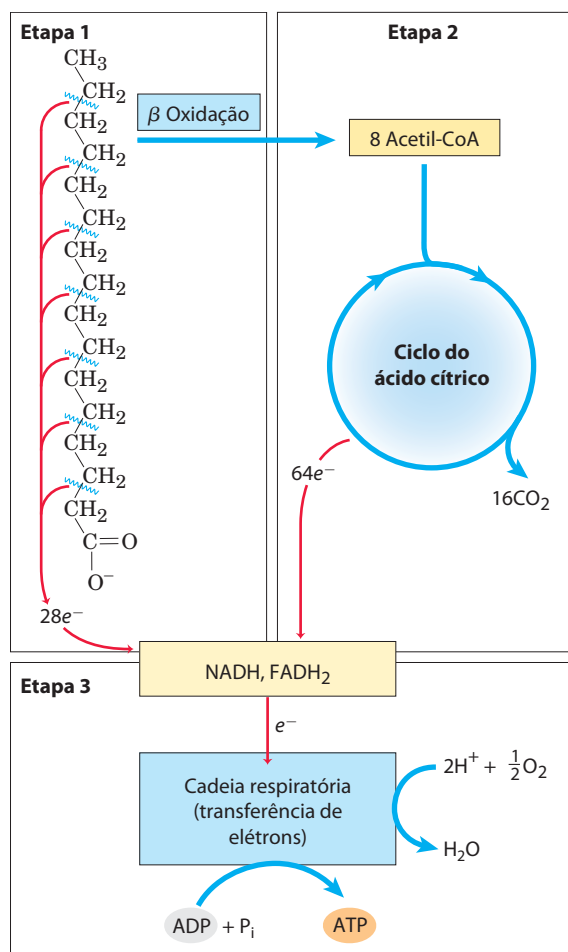



**FIGURA 17-7 Etapas da oxidação de ácidos graxos.** Etapa 1: Um ácido graxo de cadeia longa é oxidado para produzir resíduos de acetil na forma de acetil-CoA. Esse processo é chamado de $\beta$-oxidação. Etapa 2: Os grupos acetil são oxidados a $CO_2$ no ciclo do ácido cítrico. Etapa 3: Os elétrons derivados das oxidações das etapas 1 e 2 passam ao $O_2$ por meio da cadeia respiratória mitocondrial, fornecendo a energia para a síntese de ATP por fosforilação oxidativa.

te de ADP a ATP (Figura 17-7). A energia liberada pela oxidação dos ácidos graxos é, portanto, conservada como ATP.

Agora será analisada com mais atenção a primeira etapa da oxidação dos ácidos graxos, começando com o caso simples de uma cadeia acil-graxo saturada com um número par de carbonos, então passando para os casos um pouco mais complexos das cadeias insaturadas ou de número ímpar. Também será abordada a regulação da oxidação de ácidos graxos, os processos $\beta$-oxidativos que ocorrem nas outras organelas que não na mitocôndria e, finalmente, duas maneiras menos comuns de catabolismo de ácidos graxos, a $\alpha$-oxidação e a $\omega$-oxidação.

## A $\beta$-oxidação de ácidos graxos saturados tem quatro passos básicos

Quatro reações catalisadas por enzimas constituem a primeira etapa da oxidação de ácidos graxos (**Figura 17-8a**). Primeiro, a desidrogenação da acil-CoA graxo produz uma ligação dupla entre os átomos de carbono $\alpha$ e $\beta$ (C-2 e C-3), produzindo uma ***trans*-$\Delta^2$-enoil-CoA** (o símbolo $\Delta^2$ designa a posição da ligação dupla; você pode querer rever a nomenclatura dos ácidos graxos, p. 357.) Observe que a nova ligação dupla tem configuração *trans*, enquanto as ligações duplas nos ácidos graxos insaturados que ocorrem naturalmente com frequência estão na configuração *cis*. O significado dessa diferença será analisado mais tarde.

**(a)**

($C_{16}$) R—$CH_2$—$CH_2$(β)—$CH_2$(α)—C(=O)—S-CoA Palmitoil-CoA

Acil-CoA-desidrogenase: FAD → $FADH_2$

R—$CH_2$—C(H)=C(H)—C(=O)—S-CoA *trans*-$\Delta^2$-Enoil-CoA

Enoil-CoA-hidratase: $H_2O$

R—$CH_2$—C(OH)(H)—$CH_2$—C(=O)—S-CoA L-$\beta$-Hidroxiacil-CoA

$\beta$-hidroxiacil-CoA-desidrogenase: $NAD^+$ → NADH + $H^+$

R—$CH_2$—C(=O)—$CH_2$—C(=O)—S-CoA $\beta$-Cetoacil-CoA

Acil-CoA-aciltransferase (tiolase): CoA-SH

($C_{14}$) R—$CH_2$—C(=O)—S-CoA + $CH_3$—C(=O)—S-CoA

Acil-CoA (miristoil-CoA) Acetil-CoA

**(b)**

$C_{14}$ → Acetil-CoA
$C_{12}$ → Acetil-CoA
$C_{10}$ → Acetil-CoA
$C_8$ → Acetil-CoA
$C_6$ → Acetil-CoA
$C_4$ → Acetil-CoA
Acetil-CoA

**FIGURA 17-8 A via da $\beta$-oxidação.** **(a)** Em cada passagem por essa sequência de quatro passos, um resíduo acetil (sombreado em cor salmão) é removido na forma de acetil-CoA da extremidade carboxílica da cadeia acil graxo – nesse exemplo, o palmitato ($C_{16}$), que entra como palmitoil-CoA. **(b)** Mais seis passagens pela via produzem mais sete moléculas de acetil-CoA, a sétima vinda dos dois últimos átomos de carbono da cadeia de 16 carbonos. Oito moléculas de acetil-CoA são formadas no total.

Esse primeiro passo é catalisado por três isoenzimas da **acil-CoA desidrogenase**, cada uma específica para uma série de comprimentos de cadeia acil-graxo: acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa (VLCAD, de *very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase*), atuando em ácidos graxos de 12 a 18 carbonos; de cadeia média (MCAD, de *medium-chain acyl-CoA dehydrogenase*), atuando em ácidos graxos de 4 a 14 carbonos; e de cadeia curta (SCAD, de *short-chain acyl-CoA dehydrogenase*), atuando em ácidos gaxos de 4 a 8 carbonos. As três isoenzimas são flavoproteínas com FAD (ver Figura 13-27) como grupo prostético. Os elétrons removidos da acil-CoA graxo são transferidos para o FAD, e a forma reduzida da desidrogenase imediatamente doa seus elétrons a um transportador de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial, a **flavoproteína de transferência de elétrons** (ETF, de *eletron-transferring protein*) (ver Figura 19-8). A oxidação catalisada por uma acil-CoA desidrogenase é análoga à desidrogenação do succinato no ciclo do ácido cítrico (p. 646); em ambas as reações, a enzima está ligada à membrana interna, uma ligação dupla é introduzida em um ácido carboxílico entre os carbonos $\alpha$ e $\beta$, FAD é o aceptor de elétrons, e os elétrons das reações por fim entram na cadeia respiratória e passam para o $O_2$, com a síntese concomitante de cerca de 1,5 moléculas de ATP por par de elétrons.

No segundo passo do ciclo da $\beta$-oxidação (Figura 17-8a), água é adicionada à ligação dupla da *trans*-$\Delta^2$-enoil-CoA para formar o estereoisômero L da **$\beta$-hidroxiacil-CoA** (**3-hidroxiacil-CoA**). Essa reação, catalisada pela **enoil-CoA hidratase**, é análoga à reação da fumarase no ciclo do ácido cítrico, no qual $H_2O$ é adicionada a uma ligação dupla $\alpha$-$\beta$ (p.647).

No terceiro passo, L-$\beta$-hidroxiacil-CoA é desidrogenada para formar **$\beta$-cetoacil-CoA**, pela ação da **$\beta$-hidroxiacil-CoA desidrogenase**; $NAD^+$ é o aceptor de elétrons. Essa enzima é específica para o estereisômero L da hidroxiacil-CoA. O NADH formado na reação doa seus elétrons para a **NADH-desidrogenase**, um transportador de elétrons da cadeia respiratória, e ATP é formado a partir de ADP à medida que os elétrons passam para o $O_2$. A reação catalisada pela $\beta$-hidroxiacil-CoA desidrogenase é análoga à reação da malato-desidrogenase do ciclo do ácido cítrico (p. 647).

O quarto e último passo do ciclo da $\beta$-oxidação é catalisado pela **acil-CoA-acetiltransferase**, mais comumente chamada de **tiolase**, que promove a reação de $\beta$-cetoacil-CoA com uma molécula de coenzima A livre para separar o fragmento de dois carbonos da extremidade carboxílica do ácido graxo original como acetil-CoA. O outro produto é o tioéster de coenzima A do ácido graxo, agora encurtado em dois átomos de carbono (Figura 17-8a). Essa reação é chamada de tiólise, por analogia ao processo de hidrólise, já que a $\beta$-cetoacil-CoA é clivada pela reação com o grupo tiol da coenzima A. A reação da tiolase é o reverso da condensação de Claisen (ver Figura 13-4).

As três últimas etapas dessa sequência de quatro passos são catalisadas por dois conjuntos de enzimas, sendo que as enzimas utilizadas vão depender do comprimento da cadeia acil-graxo. Para cadeias com 12 carbonos ou mais, as reações são catalisadas por um complexo multienzimático associado à membrana interna da mitocôndria, **a proteína trifuncional** (**TFP**, de *trifunctional protein*). A TFP é um hetero-octâmero de subunidades $\alpha_4\beta_4$. Cada subunidade $\alpha$ possui duas atividades, a enoil-CoA-hidratase e a $\beta$-hidroxiaxil-CoA-desidrogenase; as subunidades $\beta$ possuem a atividade tiolase. Essa associação íntima de três enzimas pode permitir uma canalização eficiente do substrato de um sítio ativo para outro, sem a difusão dos intermediários para longe da superfície enzimática. Quando a TFP tiver encurtado a cadeia acil-graxo para 12 carbonos ou menos, as próximas oxidações são catalisadas por um conjunto de quatro enzimas solúveis na matriz.

Como salientado anteriormente, a ligação simples entre grupos metileno ($—CH_2—$) nos ácidos graxos é relativamente estável. A sequência da $\beta$-oxidação é um mecanismo elegante para desestabilizar e quebrar essas ligações. As três primeiras reações da $\beta$-oxidação criam uma ligação C-C muito menos estável, na qual o carbono $\alpha$ (C-2) está ligado a dois carbonos carbonílicos (o intermediário $\beta$-cetoacil-CoA). A função cetona do carbono $\beta$ (C-3) faz dele um bom alvo para ataque nucleofílico pelo —SH da coenzima A, catalisado pela tiolase. A acidez do hidrogênio $\alpha$ e a estabilização por ressonância do carbânion gerado pela saída desse hidrogênio tornam o $—CH_2—CO—S\text{-}CoA$ terminal um bom grupo de saída, facilitando a quebra da ligação $\alpha$-$\beta$.

Já foi vista uma sequência de reações praticamente idênticas a essas quatro etapas da oxidação dos ácidos graxos, nas etapas de reação do ciclo do ácido cítrico entre succinato e oxaloacetato (ver Figura 16-7). Uma sequência de reação praticamente idêntica ocorre também nas vias pelas quais os aminoácidos de cadeia lateral ramificada (isoleucina, leucina e valina) são oxidados como combustíveis (ver Figura 18-28). A **Figura 17-9** mostra as características comuns dessas três sequências, quase certamente um exemplo da conservação de um mecanismo por duplicação gênica e evolução de uma nova especificidade nos produtos enzimáticos dos genes duplicados.

## Os quatro passos da $\beta$-oxidação são repetidos para produzir acetil-CoA e ATP

Em uma passagem pela sequência da $\beta$-oxidação, uma molécula de acetil-CoA, dois pares de elétrons e quatro prótons ($H^+$) são removidos da acil-CoA graxo de cadeia longa, encurtando-a em dois átomos de carbono. A equação para uma passagem, iniciando com o éster da coenzima A do exemplo, palmitato, é

$$\text{Palmitoil-CoA} + \text{CoA} + \text{FAD} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{miristoil-CoA} + \text{acetil-CoA} + \text{FADH}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \quad (17\text{-}2)$$

Seguindo a remoção de uma unidade de acetil-CoA da palmitoil-CoA, o tioéster de coenzima A do ácido graxo encurtado (agora o miristato, com 14 carbonos) permanece. A miristoil-CoA pode agora passar por outro conjunto de quatro reações da $\beta$-oxidação, exatamente análogo ao primeiro, para produzir outra molécula de acetil-CoA e lauroil-CoA, o tioéster de coenzima A do laurato de 12 carbonos. Ao todo, sete passagens pela sequência da $\beta$-oxidação são necessárias para oxidar uma molécula de palmitoil-CoA em oito moléculas de acetil-CoA (Figura 17-8b). A equação total é

$$\text{Palmitoil-CoA} + 7\text{CoA} + 7\text{FAD} + 7\text{NAD}^+ + 7\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 8\ \text{acetil-CoA} + 7\text{FADH}_2 + 7\text{NADH} + 7\text{H}^+ \quad (17\text{-}3)$$

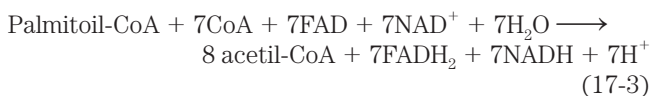
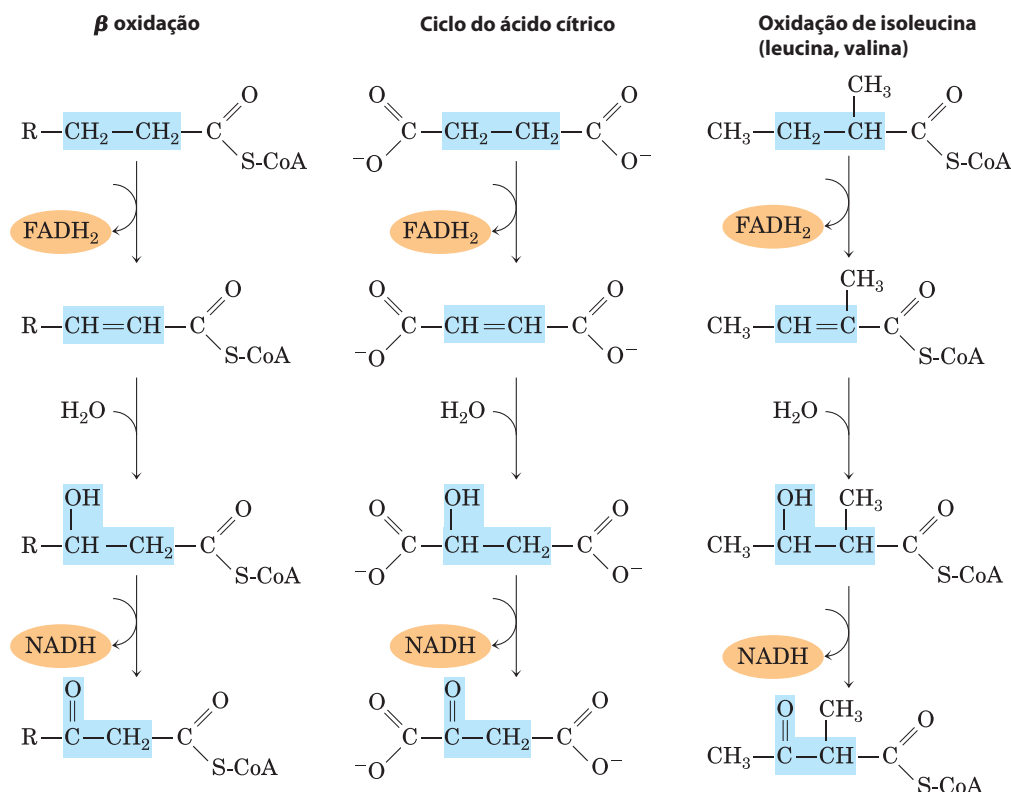
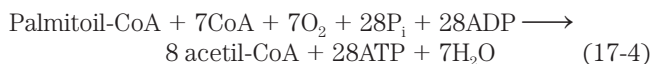



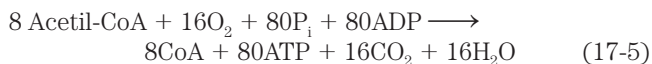
**FIGURA 17-9 A sequência de reações conservadas para introduzir uma função carbonil no carbono β e formar uma carboxila.** A via de β-oxidação para formar acil-CoA graxo, a via de succinato a oxaloacetato no ciclo do ácido cítrico, e a via pelo qual os esqueletos de carbonos desaminados da isoleucina, leucina e valina são oxidados como combustíveis, usam as mesmas sequências de reações.

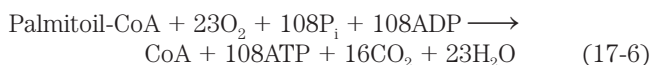
Cada molécula de $FADH_2$ formada durante a oxidação do ácido graxo doa um par de elétrons para a ETF da cadeia respiratória, e cerca de 1,5 molécula de ATP são geradas durante a transferência de cada par de elétrons para o $O_2$. Do mesmo modo, cada molécula de NADH formada doa um par de elétrons para a NADH-desidrogenase mitocondrial, e a transferência subsequente de cada par de elétrons para o $O_2$ resulta na formação de aproximadamente 2,5 moléculas de ATP. Assim, quatro moléculas de ATP são formadas para cada unidade de dois carbonos removida em uma passagem pela sequência. Observe que água também é produzida nesse processo. A transferência de elétrons do NADH ou $FADH_2$ para o $O_2$ produz uma $H_2O$ por par de elétrons. A redução do $O_2$ pelo NADH também consome um $H^+$ por molécula de NADH: $NADH + H^+ + \frac{1}{2}O_2 \longrightarrow NAD^+ + H_2O$. Em animais hibernantes, a oxidação de ácidos graxos fornece energia metabólica, calor e água – todos essenciais para a sobrevivência de um animal que não come nem bebe por longos períodos (Quadro 17-1). Os camelos obtêm água para suplementar o escasso suprimento disponível no seu ambiente natural pela oxidação de gorduras armazenadas em suas corcovas.

A equação total para a oxidação da palmitoil-CoA em oito moléculas de acetil-CoA, incluindo as transferências de elétrons e as fosforilações oxidativas, é

$$\text{Palmitoil-CoA} + 7\text{CoA} + 7O_2 + 28P_i + 28\text{ADP} \longrightarrow 8\text{ acetil-CoA} + 28\text{ATP} + 7H_2O \qquad (17\text{-}4)$$

## A acetil-CoA pode ser oxidada ainda mais no ciclo do ácido cítrico

A acetil-CoA produzida a partir da oxidação dos ácidos graxos pode ser oxidada a $CO_2$ e $H_2O$ pelo ciclo do ácido cítrico. A equação abaixo representa o balancete para a segunda etapa da oxidação da palmitoil-CoA, junto com as fosforilações acopladas da terceira etapa:

$$8\text{ Acetil-CoA} + 16O_2 + 80P_i + 80\text{ADP} \longrightarrow 8\text{CoA} + 80\text{ATP} + 16CO_2 + 16H_2O \qquad (17\text{-}5)$$

Combinando as Equações 17-4 e 17-5, obtém-se a equação total para a oxidação completa da palmitoil-CoA em dióxido de carbono e água:

$$\text{Palmitoil-CoA} + 23O_2 + 108P_i + 108\text{ADP} \longrightarrow \text{CoA} + 108\text{ATP} + 16CO_2 + 23H_2O \qquad (17\text{-}6)$$

A Tabela 17-1 resume a formação de NADH, $FADH_2$ e ATP nos passos sucessivos da oxidação da palmitoil-CoA. Observe que, como a ativação do palmitato a palmitoil-CoA quebra duas ligações fosfoanidrido do ATP (Figura 17-5), o custo energético de ativar um ácido graxo é equivalente a 2 ATP e o ganho líquido por molécula de palmitato são 106 ATP. A variação da energia-livre padrão para a oxidação do palmitato a $CO_2$ e $H_2O$ é aproximadamente 9.800 kJ/mol. Sob condições padrão, a energia recuperada na forma de energia da ligação fosfato do ATP é 106 × 30,5 kJ/mol = 3.230 kJ/mol, cerca de 33% do máximo teórico. Entretanto,

## QUADRO 17-1 Ursos gordos realizam β-oxidação durante o sono

Muitos animais dependem da gordura armazenada para obter energia durante a hibernação, em períodos migratórios e em outras situações envolvendo ajustes metabólicos radicais. Um dos ajustes mais pronunciados do metabolismo de gorduras ocorre nos ursos-pardos em hibernação. Esses animais permanecem em estado contínuo de dormência por períodos de até sete meses. Diferente da maioria das espécies hibernante, o urso mantém a temperatura corporal entre 32 e 35°C, próxima ao nível normal (não hibernando). Embora gaste aproximadamente 25.000 kJ/dia (6.000 kcal/dia), o urso não come, bebe, urina ou defeca por meses seguidos.

Estudos experimentais mostraram que os ursos-pardos em hibernação utilizam a gordura corporal como seu único combustível. A oxidação das gorduras produz energia suficiente para manter a temperatura corporal, a síntese ativa de aminoácidos e proteínas e outras atividades que requerem energia, como o transporte de membrana. A oxidação das gorduras também libera grandes quantidades de água, como descrito no texto, que repõem a água perdida na respiração. O glicerol liberado pela degradação dos triacilgliceróis é convertido em glicose sanguínea pela gliconeogênese. A ureia formada durante a degradação de aminoácidos é reabsorvida nos rins e reciclada, os grupos aminos são reutilizados para produzir novos aminoácidos para manter as proteínas corporais.

Os ursos armazenam uma enorme quantidade de gordura corporal quando em preparação para o seu longo sono. Um urso-pardo adulto consome cerca de 38.000 kJ/dia durante o final da primavera e o verão, mas à medida que o inverno se aproxima ele come durante 20 horas por dia, consumindo até 84.000 kJ por dia. Essa mudança na alimentação é uma resposta a uma mudança sazonal na secreção de hormônios. Grandes quantidades de triacilgliceróis são formadas a partir da grande ingestão de carboidratos durante o período de engorda. Outras espécies hibernantes, incluindo o minúsculo arganaz (camundongo silvestre), também acumulam grandes quantidades de gordura corporal.

Um urso-pardo prepara seu ninho de hibernação, perto do rio McNeil no Canadá.

**TABELA 17-1** Produção de ATP durante a oxidação de uma molécula de palmitoil-CoA em $CO_2$ e $H_2O$

| Enzima que catalisa o passo de oxidação | Quantidade de NADH ou $FADH_2$ formado | Quantidade de ATP formado no final* |
|---|---|---|
| Acil-CoA-desidrogenase | 7 $FADH_2$ | 10,5 |
| β-Hidroxiacil-CoA-desidrogenase | 7 NADH | 17,5 |
| Isocitrato-desidrogenase | 8 NADH | 20 |
| α-Cetoglutarato-desidrogenase | 8 NADH | 20 |
| Succinil-CoA-sintetase | | 8[†] |
| Succinato-desidrogenase | 8 $FADH_2$ | 12 |
| Malato-desidrogenase | 8 NADH | 20 |
| Total | | 108 |

*Esses cálculos pressupõem que a fosforilação oxidativa mitocondrial produz 1,5 ATP por $FADH_2$ oxidado e 2,5 ATP por NADH oxidado.

[†]O GTP produzido diretamente nesse passo produz ATP na reação catalisada pela nucleosídeo-difosfato-cinase (p. 526).

quando as mudanças de energia-livre são calculadas a partir das concentrações reais de reagentes e produtos nas condições intracelulares (ver Problema Resolvido 13-2, p. 519), a recuperação de energia-livre é maior que 60%; a conservação de energia é notavelmente eficiente.

## A oxidação de ácidos graxos insaturados requer duas reações adicionais

A sequência descrita de oxidação dos ácidos graxos é típica quando o ácido graxo é saturado (ou seja, tem apenas ligações simples na sua cadeia de carbonos). Entretanto, a maioria dos ácidos graxos nos triacilgliceróis e fosfolipídeos de animais e plantas é insaturada, tendo uma ou mais ligações duplas. Essas ligações estão na configuração *cis* e não podem sofrer a ação da enoil-CoA hidratase, a enzima que catalisa a adição de $H_2O$ às ligações duplas *trans* da $\Delta^2$-enoil-CoA gerada durante a $\beta$-oxidação. Duas enzimas auxiliares são necessárias para a $\beta$-oxidação dos ácidos graxos insaturados comuns: uma isomerase e uma redutase. Essas reações auxiliares podem ser ilustradas com dois exemplos.

O oleato é um ácido graxo abundante monoinsaturado com 18 átomos de carbono e com uma ligação dupla *cis* entre C-9 e C-10 (simbolizada por $\Delta^9$). No primeiro passo de oxidação, o oleato é convertido a oleoil-CoA e, como os ácidos graxos saturados, entra na matriz mitocondrial pelo ciclo da carnitina (Figura 17-6). A oleoil-CoA então passa três vezes pelo ciclo de oxidação dos ácidos graxos para produzir três moléculas de acetil-CoA e o éster de coenzima A de um ácido graxo insaturado de 12 átomos de carbono $\Delta^3$, a *cis*-$\Delta^3$-dodecenoil-CoA (**Figura 17-10**). Esse produto não pode servir de substrato para a enoil--CoA-hidratase, que atua apenas em ligações duplas *trans*. A enzima auxiliar **$\Delta^3$, $\Delta^2$-enoil-CoA-isomerase** isomeriza a *cis*-$\Delta^3$-enoil-CoA a *trans*-$\Delta^2$-enoil-CoA, que é convertida pela enoil-CoA-hidratase à L-$\beta$-hidroxiacil-CoA correspondente (*trans*-$\Delta^2$-dodecenoil-CoA). Esse intermediário então sofre a ação das enzimas restantes da $\beta$-oxidação para produzir acetil-CoA e o éster de coenzima A de um ácido graxo saturado de 10 carbonos, o decanoil-CoA. Esse último sofre quatro passagens pela via de $\beta$-oxidação para produzir mais cinco moléculas de acetil-CoA. No total, nove acetil-CoA são produzidas a partir de uma molécula de oleato de 18 carbonos.

A outra enzima auxiliar (uma redutase) é necessária para a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados – por exemplo, o linoleato de 18 carbonos, que tem configuração *cis*-$\Delta^9$, *cis*-$\Delta^{12}$ (**Figura 17-11**). A linoleoil-CoA sofre três passagens pela sequência de $\beta$-oxidação para produzir três moléculas de acetil-CoA e o éster de coenzima A de um ácido graxo insaturado de 12 carbonos com uma configuração *cis*-$\Delta^3$,*cis*-$\Delta^6$. Esse intermediário não pode ser utilizado pelas enzimas da via da $\beta$-oxidação; suas ligações duplas estão na posição errada e possuem uma configuração errada (*cis*, não *trans*). Entretanto, a ação combinada da enoil-CoA-isomerase e da **2,4-dienoil-CoA-redutase**, como mostrado

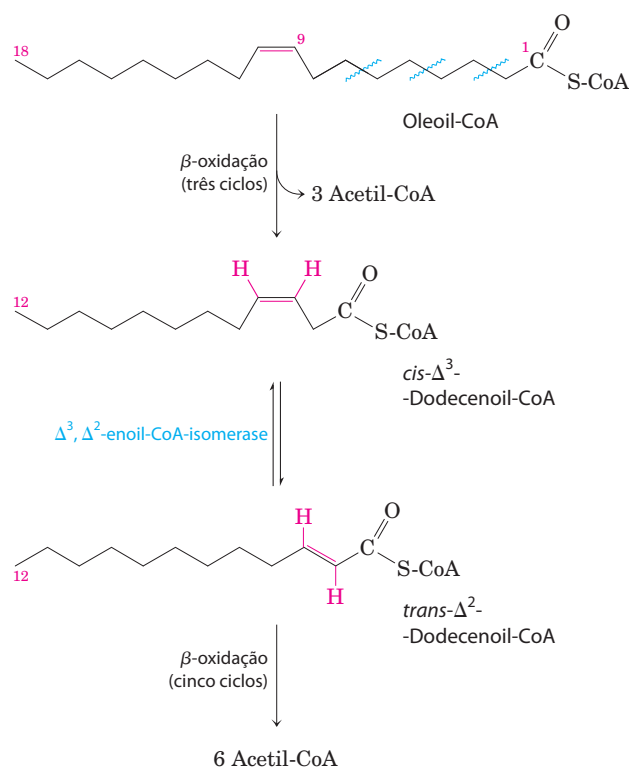



**FIGURA 17-10 Oxidação de um ácido graxo monoinsaturado.** O ácido oleico, como oleoil-CoA ($\Delta^9$), é o exemplo utilizado aqui. A oxidação requer uma enzima adicional, enoil-CoA-isomerase, para reposicionar a ligação dupla, convertendo o isômero *cis* em um isômero *trans*, um intermediário normal na $\beta$-oxidação.

na Figura 17-11, permite e reentrada desse intermediário na via da $\beta$-oxidação e a sua degradação a 6 acetil-CoA. O resultado global é a conversão de linoleato a nove moléculas de acetil-CoA.

## A oxidação completa de ácidos graxos de número ímpar requer três reações extras

Embora a maioria dos lipídeos de ocorrência natural contenha ácidos graxos com um número par de átomos de carbono, os ácidos graxos com um número ímpar de carbonos são comuns nos lipídeos de muitas plantas e de alguns organismos marinhos. O gado e outros animais ruminantes formam grandes quantidades de **propionato**, de três carbonos ($CH_3$—$CH_2$—$COO^-$), durante a fermentação dos carboidratos no rúmen. O propionato é absorvido pelo sangue e oxidado pelo fígado e outros tecidos. Pequenas quantidades de propionato são adicionadas como um inibidor de mofo em alguns pães e cereais, entrando assim na dieta humana.

Ácidos graxos de cadeia longa de número ímpar são oxidados na mesma via que os ácidos de número par, iniciando na extremidade carboxil da cadeia. Entretanto, o substrato para a última passagem pela sequência de $\beta$-oxidação é um acil-CoA graxo com um ácido graxo de cinco carbonos.

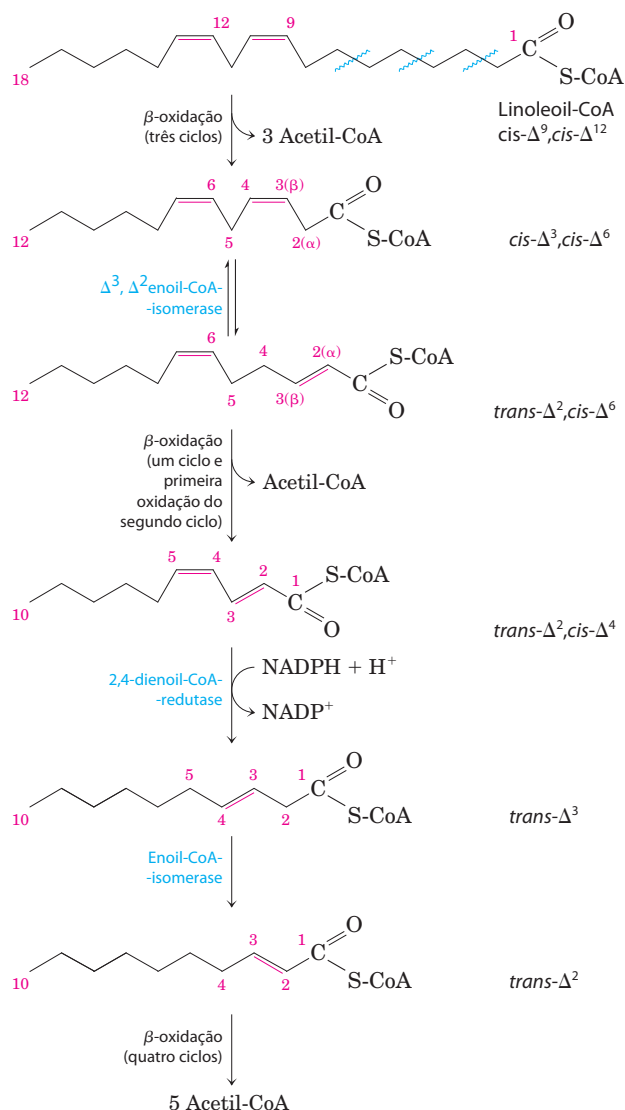



**FIGURA 17-11 Oxidação de um ácido graxo poli-insaturado.** O exemplo aqui é o ácido linoleico, como linoleoil-CoA ($\Delta^{9,12}$). A oxidação requer uma segunda enzima auxiliar além da enoil-CoA-isomerase: a 2,4-dienoil--CoA-redutase dependente de NADPH. A ação combinada dessas duas enzimas converte um intermediário *trans*-$\Delta^2$,*cis*-$\Delta^4$-dienoil-CoA ao substrato *trans*-$\Delta^2$-enoil-CoA necessário para a $\beta$-oxidação.

**FIGURA 17-12 Oxidação da propionil-CoA produzida pela $\beta$-oxidação de ácidos graxos de número ímpar.** A sequência envolve a carboxilação da propionil-CoA em D-metilmalonil-CoA e a conversão desse último em succinil-CoA. Esta conversão requer a epimerização de D- a L-metilmalonil-CoA, seguida por uma reação notável na qual os substituintes em átomos de carbono adjacentes trocam de posição (ver Quadro 17-2).

Quando é oxidado e clivado, os produtos são acetil-CoA e **propionil-CoA**. A acetil-CoA pode ser oxidada no ciclo do ácido cítrico, é claro, mas a propionil-CoA entra em uma via diferente, contendo três enzimas.

A propionil-CoA é primeiro carboxilada para formar o estereoisômero D da **metilmalonil-CoA** (**Figura 17-12**) pela **propionil-CoA-carboxilase**, que contém biotina como cofator. Nessa reação enzimática, como na reação da piruvato-carboxilase (ver Figura 16-17), o $CO_2$ (ou seu íon hidratado, $HCO_3^-$) é ativado pela ligação à biotina antes de sua transferência para o substrato, nesse caso a porção propionato. A formação do intermediário carboxibiotina requer energia, que é fornecida pelo ATP. A D-metilmalonil-CoA assim formada é enzimaticamente epimerizada ao seu estereoisômero L pela **metilmalonil-CoA-epimerase** (Figura 17-12). A L-metilmalonil-CoA então sofre um rearranjo intramolecular para formar succinil-CoA, que pode entrar no ciclo do ácido cítrico. Esse rearranjo é catalisado pela **metilmalonil-CoA-mutase**, que requer como coenzima **5′-desoxiadenosilcobalamina**, ou **coenzima $B_{12}$**, que é derivada da vitamina $B_{12}$ (cobalamina). O Quadro 17-2 descreve o papel da coenzima $B_{12}$ nessa notável reação de troca.

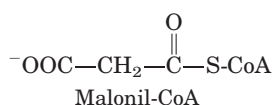
## A oxidação dos ácidos graxos é estritamente regulada

A oxidação dos ácidos graxos consome um combustível precioso e é regulada de forma que ocorra apenas quando houver a necessidade de energia. No fígado, a acil-graxo-CoA formada no citosol tem duas vias principais abertas: (1) $\beta$--oxidação por enzimas na mitocôndria ou (2) conversão em triacilgliceróis e fosfolipídeos por enzimas no citosol. A via tomada depende da taxa de transferência de acil-graxos--CoA de cadeia longa para dentro da mitocôndria. O pro-

cesso de três passos (ciclo da carnitina) pelo qual os grupos acil-graxos-CoA são carregados da acil-CoA graxo citosólica para a matriz mitocondrial (Figura 17-6) é o limitante para a oxidação de ácidos graxos, sendo um ponto de regulação importante. Uma vez que os grupos acil-graxos entram na mitocôndria, eles estão destinados à oxidação em acetil--CoA.

A **malonil-CoA**, o primeiro intermediário na biossíntese citosólica de ácidos graxos de cadeia longa a partir da acetil-CoA (ver Figura 21-2), tem sua concentração aumentada quando o animal está bem suprido de carboidratos; o excesso de glicose, que não pode ser oxidado ou armazenado como glicogênio, é convertido em ácidos graxos no citosol, para armazenamento como triacilglicerol. A inibição da carnitina-aciltransferase I pela malonil-CoA (**Figura 17-13**) garante que a oxidação de ácidos graxos seja inibida quando o fígado está amplamente suprido de glicose como combustível e está produzindo triacilgliceróis a partir do excesso de glicose.

$$^{-}OOC—CH_2—\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}—S\text{-}CoA$$

Malonil-CoA

Duas das enzimas da $\beta$-oxidação também são reguladas por metabólitos que sinalizam a suficiência de energia. Quando a razão [NADH/NAD$^+$] é alta, a $\beta$-hidroxiacil-CoA--desidrogenase é inibida; além disso, altas concentrações de acetil-CoA inibem a tiolase.

Lembre-se do Capítulo 15 que, durante períodos de contração muscular vigorosa ou durante o jejum, a queda na [ATP] e o aumento da [AMP] ativam a proteína-cinase ativada por AMP (AMPK, de *AMP-activated protein kinase*). A AMPK fosforila várias enzimas-alvo, incluindo a acetil-CoA-carboxilase, que catalisa a síntese de malonil--CoA. Essa fosforilação, e consequentemente a inibição da acetil-CoA-carboxilase, diminui a concentração de malonil--CoA, aliviando a inibição do transporte de acil-carnitina--graxo para a mitocôndria (Figura 17-13) e permitindo que a $\beta$-oxidação reabasteça o suprimento de ATP.

## Fatores de transcrição ativam a síntese de proteínas do catabolismo de lipídeos

Além dos vários mecanismos regulatórios de curta duração que modulam a atividade de enzimas existentes, a regulação transcricional pode variar o número de moléculas das enzimas da oxidação dos ácidos graxos em uma escala de tempo maior, de minutos a horas. A família **PPAR** (receptor ativado por proliferadores de peroxissomos) de receptores nucleares são fatores de transcrição que afetam muitos processos metabólicos em resposta a uma variedade de ligantes semelhantes aos ácidos graxos. (Eles foram originalmente identificados como receptores ativados por proliferadores de peroxissomos, em seguida, observou-se que funcionam mais amplamente.) O PPAR$\alpha$ age no músculo, tecido adiposo e no fígado para ativar um grupo de genes essenciais para a oxidação de ácidos graxos, incluindo os transportadores

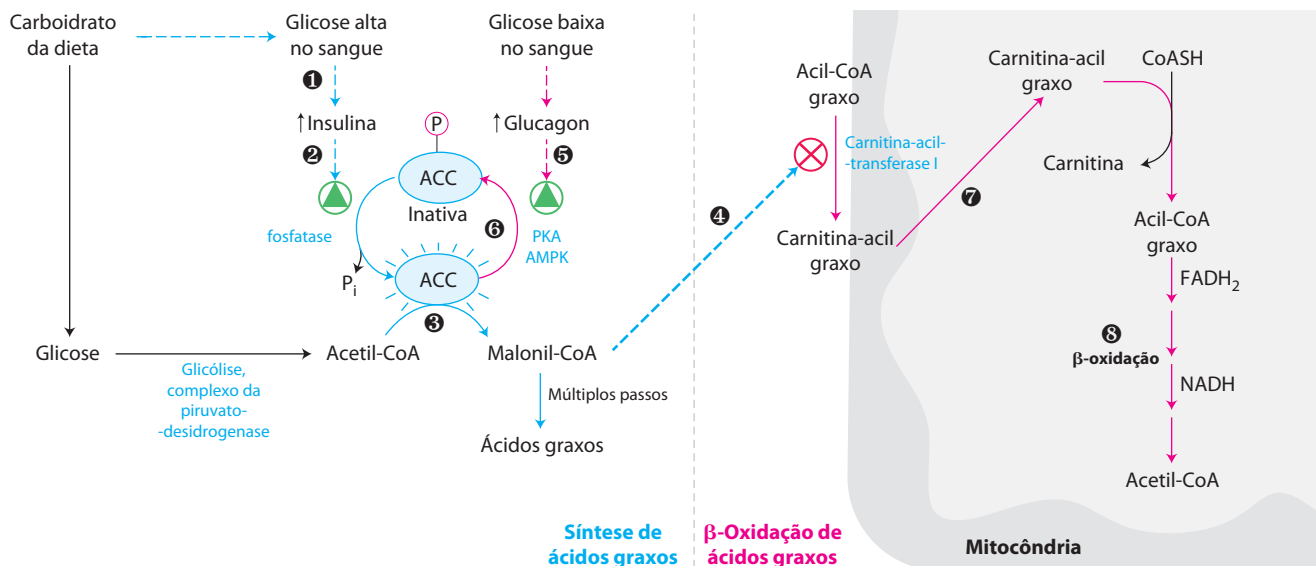



**FIGURA 17-13 Regulação coordenada da síntese e da degradação dos ácidos graxos.** Quando a dieta disponibiliza uma fonte imediata de carboidratos como combustível, a $\beta$-oxidação dos ácidos graxos é desnecessária, sendo, portanto, desativada. Duas enzimas são essenciais na coordenação do metabolismo dos ácidos graxos: a acetil-CoA-carboxilase (ACC), primeira enzima na síntese dos ácidos graxos (ver Figura 21-1), e a carnitina--aciltransferase I, que limita o transporte de ácidos graxos para dentro da matriz mitocondrial para a $\beta$-oxidação (ver Figura 17-6). A ingestão de uma refeição rica em carboidratos aumenta o nível de glicose no sangue e, portanto, ❶ ativa a liberação de insulina. ❷ A proteína-fosfatase dependente de insulina desfosforila a ACC, ativando-a. ❸ A ACC catalisa a formação de malonil-CoA (o primeiro intermediário da síntese de ácidos graxos), e ❹ o malonil-CoA inibe a carnitina-aciltransferase I, impedindo assim a entrada de ácidos graxos na matriz mitocondrial. Quando baixam os níveis de glicose no sangue, entre as refeições, ❺ a liberação de glucagon ativa a proteína-cinase dependente de cAMP (PKA), que ❻ fosforila e inativa a ACC. Com a baixa concentração de malonil-CoA, a inibição da entrada de ácidos graxos na mitocôndria é aliviada, e ❼ os ácidos graxos entram na matriz mitocondrial e ❽ tornam-se o principal combustível. Como o glucagon também ativa a mobilização de ácidos graxos no tecido adiposo, um suprimento de ácidos graxos começa a chegar ao sangue.

## QUADRO 17-2 Coenzima $B_{12}$: uma solução radical para um problema desconcertante

Na reação da metilmalonil-CoA-mutase (ver Figura 17-12), o grupo —CO—S-CoA no C-2 do propionato original troca de posição com um átomo de hidrogênio em C-3 do propionato original (Figura Q-1a). A coenzima $B_{12}$ é o cofator para essa reação, assim como para quase todas as enzimas que catalisam reações desse tipo (Figura Q-1b). Esses processos dependentes de coenzima $B_{12}$ estão dentre as poucas reações enzimáticas biológicas em que existe a troca de um grupo alquil ou alquil substituído (X) com um átomo de hidrogênio em um carbono adjacente, *sem a mistura do átomo de hidrogênio transferido com o hidrogênio do solvente*, $H_2O$. Como pode o átomo de hidrogênio mover entre dois carbonos sem se misturar com o enorme excesso de átomos de hidrogênio do solvente?

(a) L-Metilmalonil-CoA ⇌ (coenzima $B_{12}$; metilmalonil-CoA-mutase) Succinil-CoA

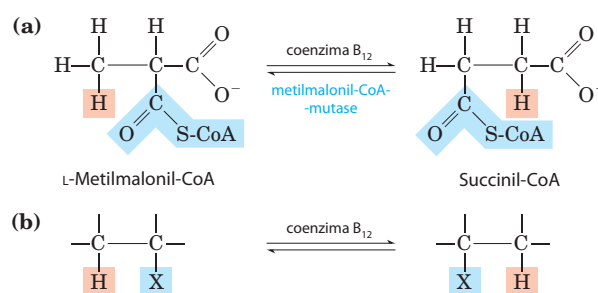
(b) ⇌ (coenzima $B_{12}$)

**FIGURA Q-1**

A coenzima $B_{12}$ é a forma cofator da vitamina $B_{12}$, única dentre todas as vitaminas por conter não apenas uma molécula orgânica complexa, mas também um elemento traço essencial, o cobalto. O complexo **sistema de anel da corrina** da vitamina $B_{12}$ (colorido em azul na Figura Q-2), ao qual o cobalto (como $Co^{3+}$) está coordenado, é quimicamente relacionado ao sistema de anéis da porfirina do heme e das hemeproteínas (ver Figura 5-1). Uma quinta posição de coordenação do cobalto está preenchida pelo ribonucleotídeo dimetilbenzimidazol (sombreado em amarelo), ligado covalentemente pelo seu grupo 3′-fosfato a uma cadeia lateral do anel corrina, através do aminoisopropanol. A formação desse cofator complexo ocorre em uma de apenas duas reações conhecidas em que o trifosfato do ATP é clivado (Figura Q-3); a outra reação é a formação de *S*-adenosilmetionina a partir de ATP e metionina (ver Figura 18-18).

A vitamina $B_{12}$ na forma em que geralmente é isolada é chamada **cianocobalamina**, porque contém um grupo ciano (capturado durante a purificação) ligado ao cobalto na sexta posição de coordenação. Na **5′-desoxiadenosilcobalamina**, o cofator para a metilmalonil-CoA-mutase, o grupo ciano é substituído pelo grupo 5′-desoxiadenosil (vermelho na Figura Q-2), covalentemente ligado pelo C-5′ ao cobalto. A estrutura tridimensional do cofator foi determinada por Dorothy Crowfoot Hodgkin em 1956, por cristalografia por raios X.

Dorothy Crowfoot Hodgkin, 1910–1994

A chave para entender como a coenzima $B_{12}$ catalisa a troca de hidrogênio está nas propriedades da ligação covalente entre o cobalto e o C-5′ do grupo desoxiadenosil (Figura Q-2). Essa ligação é relativamente fraca; sua energia de dissociação da ligação é cerca de 110 kJ/mol, comparada com 348 kJ/mol da ligação C—C típica ou 414 kJ/mol da ligação C—H. A mera iluminação do composto com luz visível é suficiente para quebrar a ligação Co—C. (Essa fotolabilidade extrema provavelmente seja responsável pela ausência de vitamina $B_{12}$ nas plantas). A dissociação produz um radical 5′-desoxiadenosil e a forma $Co^{2+}$ da vitamina. A função química da 5′-desoxiadenosilcobalamina é gerar radicais livres, dessa forma iniciando uma série de transformações tal como aquela ilustrada na Figura Q-4 – um mecanismo postulado para a

5′Desoxi-adenosina; Sistema de anel da corrina; Amino-isopropanol; Ribonucleotídeo dimetil-benzimidazol

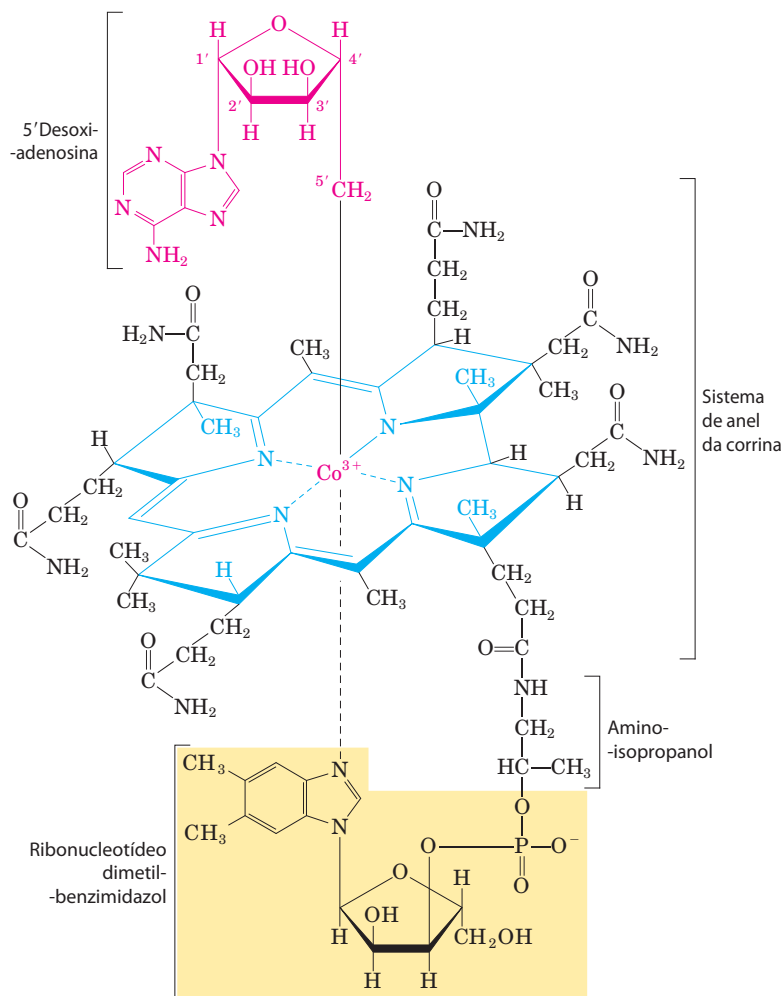
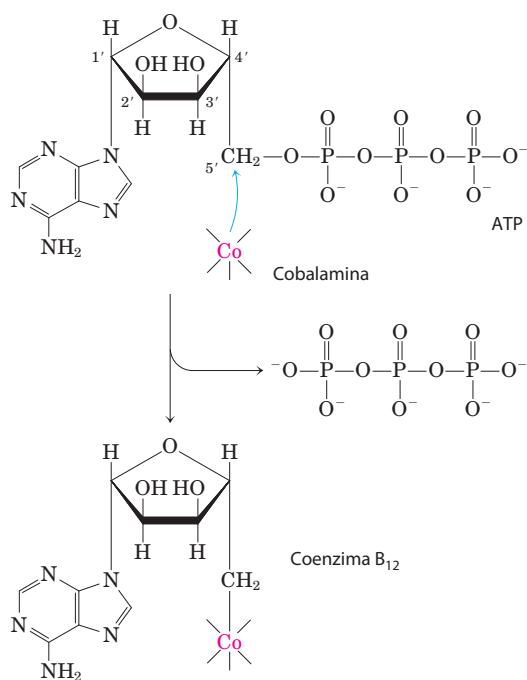



**FIGURA Q-2**

reação catalisada pela metilmalonil-CoA-mutase e várias outras transformações dependentes de coenzimas $B_{12}$. Nesse mecanismo postulado, o átomo de hidrogênio que migra nunca existe como uma espécie livre e consequentemente nunca está livre para trocar com o hidrogênio de moléculas de água ambiente.

A deficiência de vitamina $B_{12}$ resulta em doença grave. Essa vitamina não é sintetizada pelas plantas ou pelos animais e podem ser sintetizadas apenas por poucas espécies de microrganismos. Ela é necessária para pessoas saudáveis apenas em quantidades pequenas, cerca de 3 $\mu$g/dia. A **anemia perniciosa**, doença grave, resulta da falha da absorção eficiente de vitamina $B_{12}$ pelo intestino, onde é sintetizada pelas bactérias intestinais ou obtida pela digestão da carne. Indivíduos com essa doença não produzem quantidades suficientes do **fator intrínseco**, glicoproteína essencial para absorção da vitamina $B_{12}$. A patologia da anemia perniciosa inclui a produção reduzida de eritrócitos, níveis reduzidos de hemoglobina e dano progressivo e severo do sistema nervoso central. A administração de altas doses de vitamina $B_{12}$ alivia esses sintomas em pelo menos alguns casos. ■

ATP

Cobalamina

Coenzima $B_{12}$

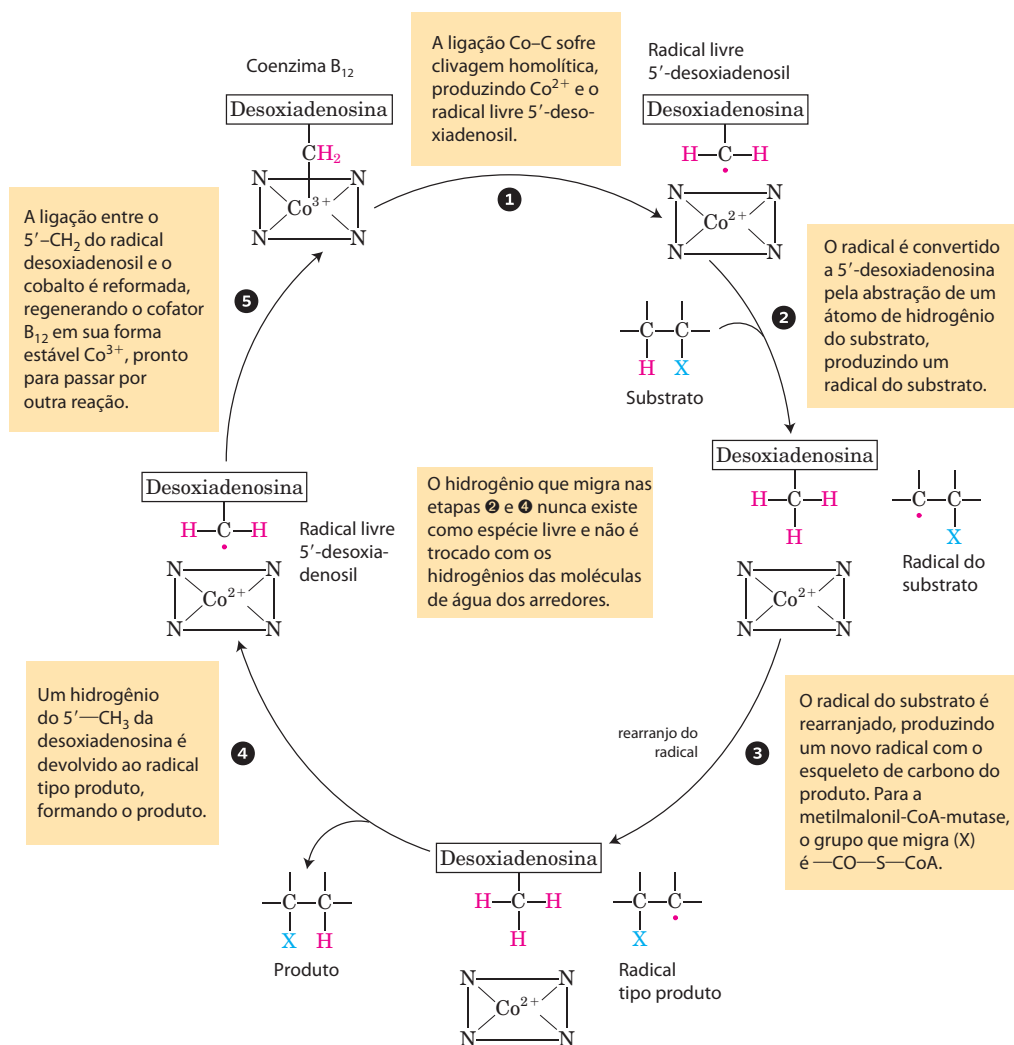



**FIGURA Q-3**

**MECANISMO – FIGURA Q-4**

de ácidos graxos, carnitina-aciltransferases I e II, acil-graxo--CoA-desidrogenases de cadeias acila curta, média, longa e muito longa e enzimas relacionadas. Essa resposta é disparada quando uma célula ou organismo tem uma demanda aumentada por energia do catabolismo das gorduras, tal como durante o jejum entre as refeições ou sob condição de fome por longo período. O glucagon, liberado em resposta à baixa concentração de glicose no sangue, pode agir por meio do cAMP e do fator de transcrição CREB para ativar certos genes para o catabolismo de lipídeos.

Outra situação acompanhada por grandes mudanças na expressão das enzimas da oxidação dos ácidos graxos é a transição do metabolismo fetal para o neonatal no coração. No feto, os combustíveis principais são glicose e lactato, mas no coração do neonato, os ácidos graxos são o principal combustível. No momento dessa transição, o PPAR$\alpha$ é ativado, que por sua vez ativa os genes essenciais para o metabolismo dos ácidos graxos. Como será visto no Capítulo 23, dois outros fatores de transcrição da família PPAR também desempenham papéis cruciais no ajuste dos complementos das enzimas – e consequentemente, as atividades metabólicas – de tecidos específicos em períodos específicos (ver Figura 23-42).

O principal local de oxidação dos ácidos graxos, no descanso e durante o exercício, é o músculo esquelético. O treino para exercícios de resistência aumenta a expressão de PPAR$\alpha$ no músculo, levando a níveis elevados das enzimas de oxidação dos ácidos graxos e aumento da capacidade oxidativa do músculo.

## Defeitos genéticos nas acil-CoA-graxo-desidrogenases causam doenças graves

Os triacilgliceróis estocados são as principais fontes de energia para a contração muscular, e a incapacidade de oxidar ácidos graxos a partir de triacilgliceróis tem sérias consequências para a saúde. O defeito genético mais comum no catabolismo de ácidos graxos nos EUA e em populações do norte da Europa é devido a uma mutação no gene que codifica a **acil-CoA-desidrogenase de cadeia média** (**MCAD**). Dentre os europeus setentrionais, a frequência de portadores (indivíduos com essa mutação recessiva em um de dois cromossomos homólogos) é cerca de 1 em 40, e cerca de 1 indivíduo em 10.000 tem a doença – ou seja, tem duas cópias do alelo de MCAD mutante e é incapaz de oxidar ácidos graxos de 6 a 12 átomos de carbonos. A doença é caracterizada por episódios recorrentes de uma síndrome que inclui acúmulo de gordura no fígado, altos níveis sanguíneos de ácido octanoico (8:0), baixo nível de glicose no sangue (hipoglicemia), sonolência, vômito e coma. O perfil dos ácidos orgânicos na urina auxilia no diagnóstico da doença: geralmente a urina contém altos níveis de ácidos dicarboxílicos de 6 a 10 carbonos (produzidos por $\omega$-oxidação) e baixos níveis de corpos cetônicos urinários (a $\omega$-oxidação é discutida abaixo, e corpos cetônicos, na Seção 17.3). Embora talvez os indivíduos não apresentem sintomas entre os episódios, esses são muito graves; a mortalidade dessa doença é de 25% a 60% na primeira infância. Se o defeito genético for detectado logo após o nascimento, o recém-nascido pode receber uma dieta pobre em gordura e rica em carboidratos. Com a detecção precoce e gestão cuidadosa da dieta – inclusive evitando intervalos longos entre as refeições, para prevenir que o corpo mobilize suas reservas de gordura para obter energia – o prognóstico para esses indivíduos é bom.

Mais de 20 outros defeitos genéticos em humanos para o transporte ou oxidação de ácidos graxos tem sido documentado, a maioria muito menos comum que o defeito na MCAD. Um dos distúrbios mais severos resulta da perda da atividade $\beta$-hidroxiacil-CoA-desidrogenase de cadeia longa da proteína trifuncional, TFP. Outros distúrbios incluem defeitos nas subunidades $\alpha$ ou $\beta$ que afetam todas as três atividades da TFP e causam doenças cardíacas graves e músculo esquelético anormal. ■

## Os peroxissomos também realizam $\beta$-oxidação

A matriz mitocondrial é o principal local de oxidação de ácidos graxos nas células animais, mas em certas células outros compartimentos também contêm as enzimas capazes de oxidar ácidos graxos a acetil-CoA, por uma via similar, mas não idêntica àquela mitocondrial. Em células vegetais, o principal local da $\beta$-oxidação não é a mitocôndria, mas os peroxissomos.

Nos **peroxissomos**, organelas de células animais e vegetais envoltas por membrana, os intermediários para a $\beta$--oxidação dos ácidos graxos são derivados da coenzima A, e o processo consiste em quatro etapas, como na $\beta$-oxidação mitocondrial (**Figura 17–14**): (1) desidrogenação, (2) adição de água à dupla ligação resultante, (3) oxidação do $\beta$--hidroxiacil-CoA a uma cetona, e (4) clivagem tiolítica pela coenzima A. (As reações idênticas também ocorrem nos glioxissomos, como discutidos abaixo.)

Uma diferença entre as vias peroxissomal e mitocondrial está na química da primeira etapa. Nos peroxissomos, a flavoproteína acil-CoA oxidase, que introduz a dupla ligação, passa os elétrons diretamente ao $O_2$, produzindo $H_2O_2$ (Figura 17–14). (Por isso, o nome "peroxissomos".) Esse oxidante forte e potencialmente danoso é imediatamente clivado a $H_2O$ e $O_2$ pela **catalase**. Lembre-se que na mitocôndria, os elétrons removidos na primeira etapa de oxidação passam pela cadeia respiratória até o $O_2$ para produzir $H_2O$ e esse processo é acompanhado pela síntese de ATP. Nos peroxissomos, a energia liberada na primeira etapa oxidativa da degradação dos ácidos graxos não é conservada como ATP, mas sim dissipada como calor.

Uma segunda diferença importante entre a $\beta$-oxidação mitocondrial e a peroxissomal em mamíferos é a especificidade para as acil-CoA graxos; o sistema peroxissomal é muito mais ativo sobre ácidos graxos de cadeia muito longa tal como ácido fitânico e ácido pristânico (ver Figura 17-18). Esses ácidos graxos menos comuns são obtidos na dieta a partir de produtos lácteos, de gordura de animais ruminantes, carne e peixe. Seu catabolismo no peroxissomo envolve várias enzimas auxiliares exclusivas dessa organela. A incapacidade de oxidar esses compostos é responsável por várias doenças humanas graves. Indivíduos com a **síndrome de Zellweger** são incapazes de formar peroxissomos e, consequentemente, carecem de todo metabolismo exclusivo àquela organela. Na **adrenoleucodistrofia ligada ao X** (**XALD**), os peroxissomos falham em oxidar ácidos graxos de cadeia muito longa, aparentemente pela per-

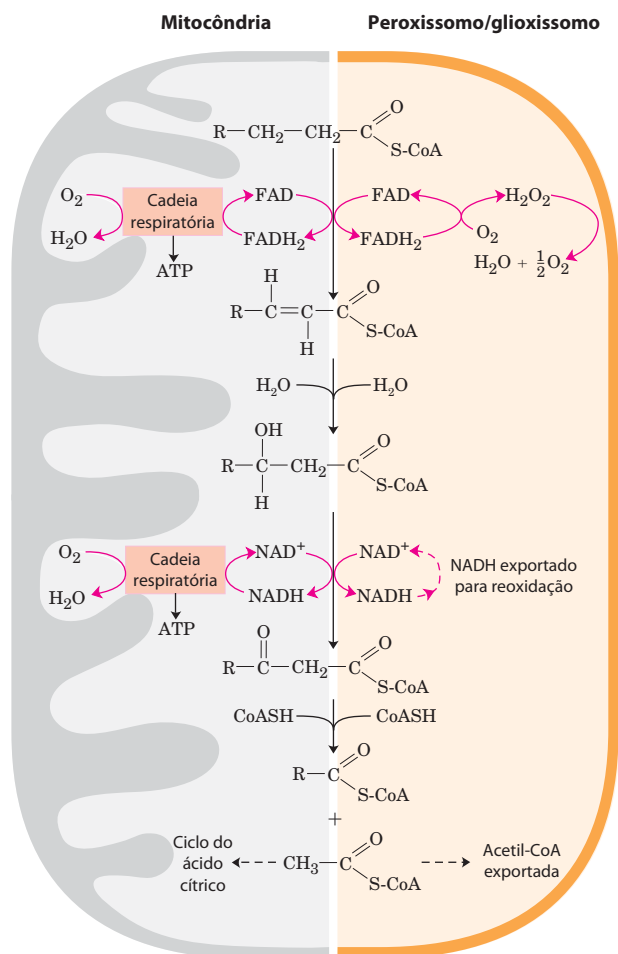



**FIGURA 17-14 Comparação entre a $\beta$-oxidação nas mitocôndrias e nos peroxissomos e glioxissomos.** O sistema peroxissomal/glioxissomal difere do sistema mitocondrial em três aspectos: (1) o sistema peroxissomal prefere ácidos graxos de cadeia muito longa; (2) no primeiro passo oxidativo, os elétrons passam diretamente para o $O_2$, gerando $H_2O_2$, e (3) o NADH formado no segundo passo oxidativo não pode ser reoxidado no peroxissomo ou no glioxissomo, então equivalentes redutores são exportados ao citosol, e finalmente entram nas mitocôndrias. A acetil-CoA produzida pelos peroxissomos e glioxissomos também é exportada; o acetato dos glioxissomos (organelas encontradas apenas nas sementes em germinação) serve como um precursor biossintético (ver Figura 17-15). A acetil-CoA produzida nas mitocôndrias é oxidada mais adiante no ciclo do ácido cítrico.

da de um transportador funcional para esses ácidos graxos na membrana peroxissomal. Ambos os defeitos levam ao acúmulo no sangue de ácidos graxos de cadeia muito longa, especialmente 26:0. XALD afeta meninos jovens com idade inferior a 10 anos, causando perda de visão, transtornos de comportamento e morte dentro de poucos anos. ■

Em mamíferos, altas concentrações de gorduras na dieta resultam em síntese aumentada das enzimas peroxissomais da $\beta$-oxidação no fígado. Os peroxissomos hepáticos não contêm as enzimas do ciclo do ácido cítrico e não podem catalisar a oxidação de acetil-CoA a $CO_2$. Em vez disso, os ácidos graxos de cadeia longa ou ramificados são catabolizados a produtos de cadeia curta, tal como hexanoil-CoA, que são exportados para a mitocôndria e completamente oxidados.

## Os peroxissomos e glioxissomos vegetais usam acetil-CoA da $\beta$-oxidação como precursor biossintético

Em plantas, a oxidação dos ácidos graxos não ocorre principalmente na mitocôndria, mas nos peroxissomos do tecido foliar e nos glioxissomos das sementes em germinação. Os peroxissomos e glioxissomos de plantas são semelhantes em estrutura e função; os glioxissomos, que ocorrem apenas em sementes em germinação, podem ser considerados peroxissomos especializados. O papel biológico da $\beta$-oxidação nessas organelas é usar lipídeos estocados principalmente para prover precursores biossintéticos, não energia.

Durante a germinação de sementes, os triacilgliceróis estocados são convertidos em glicose, sacarose e em uma ampla variedade de metabólitos essenciais (**Figura 17-15**). Os ácidos graxos liberados a partir dos triacilgliceróis são primeiro ativados aos seus derivados de coenzima A e oxidados nos glioxissomos pelo mesmo processo de quatro etapas que ocorre nos peroxissomos (Figura 17–14). O acetil-CoA produzido é convertido por meio do ciclo do glioxilato a precursores de quatro carbonos para a gliconeogênese (ver Figura 16-24). Os glioxissomos, como os peroxissomos, contêm altas concentrações de catalase, que converte o $H_2O_2$ produzido pela $\beta$-oxidação a $H_2O$ e $O_2$.

## As enzimas da $\beta$-oxidação de organelas diferentes divergiram durante a evolução

Embora as reações da $\beta$-oxidação na mitocôndria sejam essencialmente as mesmas daquelas nos peroxissomos e nos glioxissomos, as enzimas (isoenzimas) diferem significativamente entre os dois tipos de organelas. As diferenças, aparentemente, refletem uma divergência evolutiva que

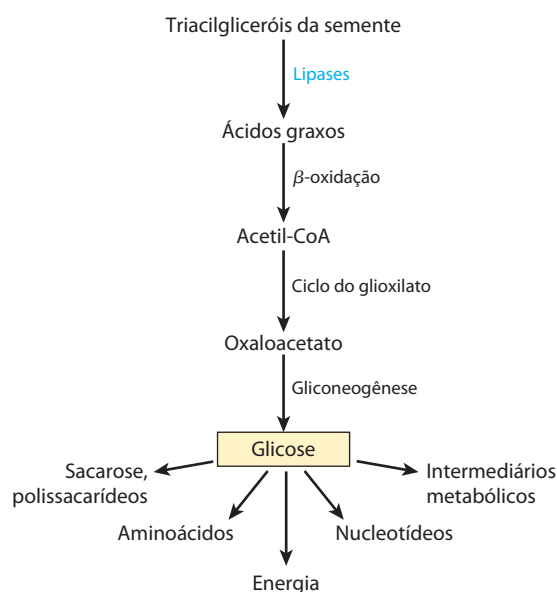



**FIGURA 17-15 Triacilgliceróis como fonte de glicose nas sementes.** A $\beta$-oxidação é um estágio em uma via que converte os estoques de triacilgliceróis em glicose nas sementes em germinação. Mais detalhes na Figura 16-24.

ocorreu muito cedo, com a separação entre as bactérias gram-positivas e gram-negativas (ver Figura 1-6).

Na mitocôndria, as quatro enzimas da $\beta$-oxidação que atuam sobre os acil-graxos-CoAs de cadeia curta são proteínas solúveis distintas (como descrito anteriormente), similares em estrutura às enzimas análogas das bactérias gram-positivas (**Figura 17–16a**). As bactérias gram-negativas têm quatro atividades em três subunidades solúveis (Figura 17-16b), e o sistema enzimático eucariótico que atua sobre os ácidos graxos de cadeia longa – a proteína trifuncional, TFP – tem três atividades enzimáticas em duas subunidades que estão associadas à membrana (Figura 17-16c). As enzimas da $\beta$-oxidação dos peroxissomos e glioxissomos vegetais, no entanto, formam um complexo de proteínas, cada uma contendo quatro atividades enzimáticas em uma única cadeia polipeptídica (Figura 17-16d). A primeira enzima, a acil-graxo-oxidase, é uma cadeia polipeptídica única; a **proteína multifuncional** (**MFP**) contém a segunda e a terceira atividade enzimática (enoil-CoA-hidratase e hidroxiacil-CoA-desidrogenase), assim como duas atividades auxiliares necessárias para a oxidação dos ácidos graxos insaturados (D-3-hidroxiacil-CoA-epimerase e $\Delta^3$, $\Delta^2$-enoil-CoA-isomerase); a quarta enzima, tiolase, é um polipeptídeo solúvel distinto.

É interessante que as enzimas que catalisam essencialmente o inverso da $\beta$-oxidação, para a síntese dos ácidos graxos, também estão organizadas de forma diferente em bactérias e em eucariotos; nas bactérias, as sete enzimas necessárias para a síntese dos ácidos graxos são polipeptídeos distintos, já em mamíferos, todas as sete atividades fazem parte de uma única e grande cadeia polipeptídica. Uma vantagem para a célula em ter várias enzimas da mesma via codificadas em uma única cadeia polipeptídica é solucionar o problema da regulação da síntese de enzimas que devem interagir funcionalmente; a regulação da expressão de *um* gene garante a produção do mesmo número de sítios ativos para todas as enzimas da via. Quando cada atividade enzimática está em polipeptídeos distintos, algum mecanismo é necessário para coordenar a síntese de todos os produtos gênicos. A *desvantagem* em ter várias atividades no mesmo polipeptídeo é que quanto maior a cadeia polipeptídica maior é a probabilidade de um erro em sua síntese: um único aminoácido incorreto na cadeia pode tornar inúteis todas as atividades enzimáticas naquela cadeia. A comparação das estruturas gênicas para essas proteínas em muitas espécies pode esclarecer as razões para a seleção de uma ou outra estratégia durante a evolução.

## A $\omega$-oxidação de ácidos graxos ocorre no retículo endoplasmático

Embora a $\beta$-oxidação mitocondrial, na qual enzimas atuam na extremidade carboxil de um ácido graxo, seja o destino catabólico mais importante para os ácidos graxos nas células animais, existe outra via em algumas espécies, incluindo vertebrados, que envolve a oxidação do carbono $\omega$ (ômega) – o carbono mais distante do grupo carboxila. As enzimas exclusivas da **$\omega$-oxidação** estão localizadas (em vertebrados) no retículo endoplasmático do fígado e dos rins, e os substratos preferidos são os ácidos graxos de 10 a

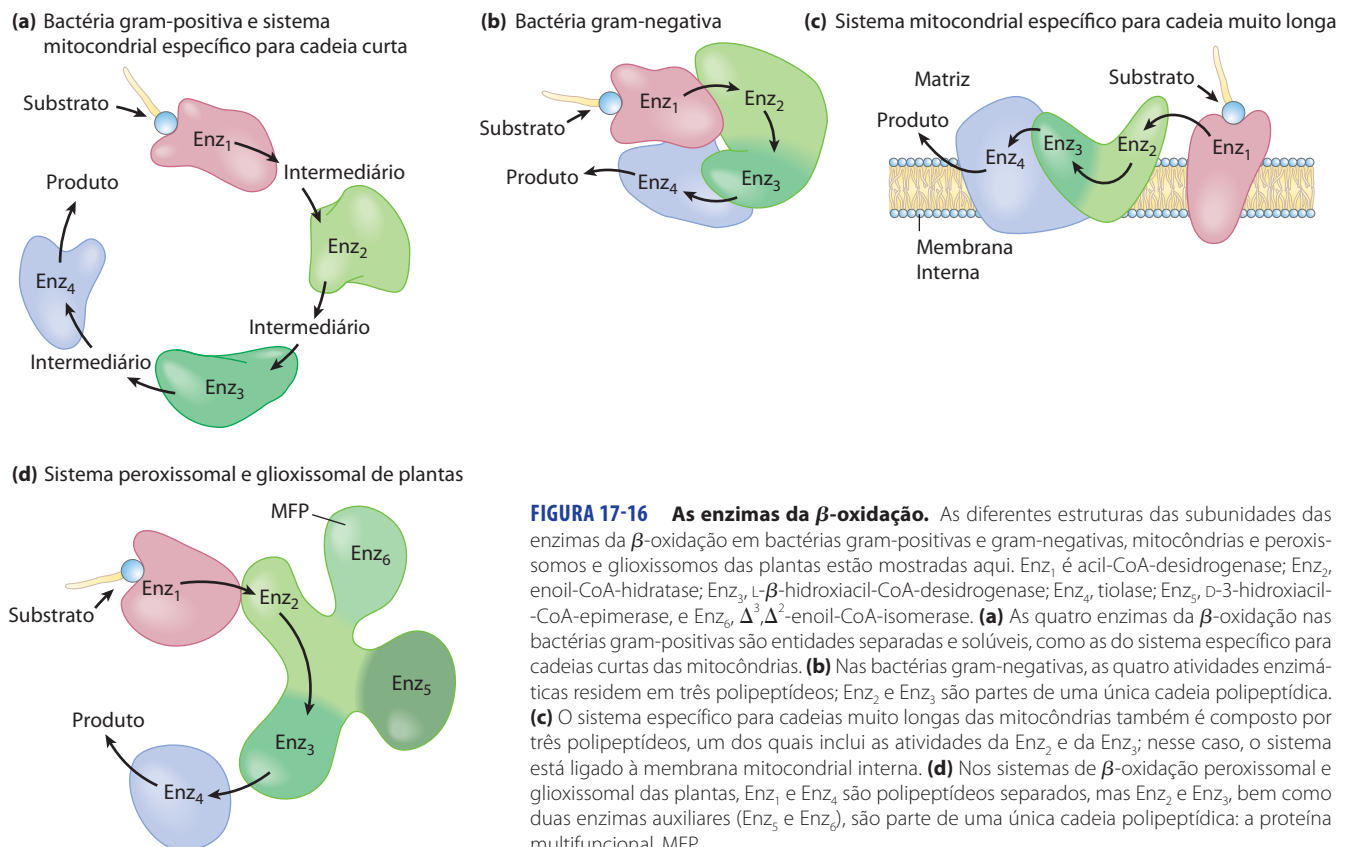



**FIGURA 17-16 As enzimas da $\beta$-oxidação.** As diferentes estruturas das subunidades das enzimas da $\beta$-oxidação em bactérias gram-positivas e gram-negativas, mitocôndrias e peroxissomos e glioxissomos das plantas estão mostradas aqui. $Enz_1$ é acil-CoA-desidrogenase; $Enz_2$, enoil-CoA-hidratase; $Enz_3$, L-$\beta$-hidroxiacil-CoA-desidrogenase; $Enz_4$, tiolase; $Enz_5$, D-3-hidroxiacil-CoA-epimerase, e $Enz_6$, $\Delta^3$,$\Delta^2$-enoil-CoA-isomerase. **(a)** As quatro enzimas da $\beta$-oxidação nas bactérias gram-positivas são entidades separadas e solúveis, como as do sistema específico para cadeias curtas das mitocôndrias. **(b)** Nas bactérias gram-negativas, as quatro atividades enzimáticas residem em três polipeptídeos; $Enz_2$ e $Enz_3$ são partes de uma única cadeia polipeptídica. **(c)** O sistema específico para cadeias muito longas das mitocôndrias também é composto por três polipeptídeos, um dos quais inclui as atividades da $Enz_2$ e da $Enz_3$; nesse caso, o sistema está ligado à membrana mitocondrial interna. **(d)** Nos sistemas de $\beta$-oxidação peroxissomal e glioxissomal das plantas, $Enz_1$ e $Enz_4$ são polipeptídeos separados, mas $Enz_2$ e $Enz_3$, bem como duas enzimas auxiliares ($Enz_5$ e $Enz_6$), são parte de uma única cadeia polipeptídica: a proteína multifuncional, MFP.

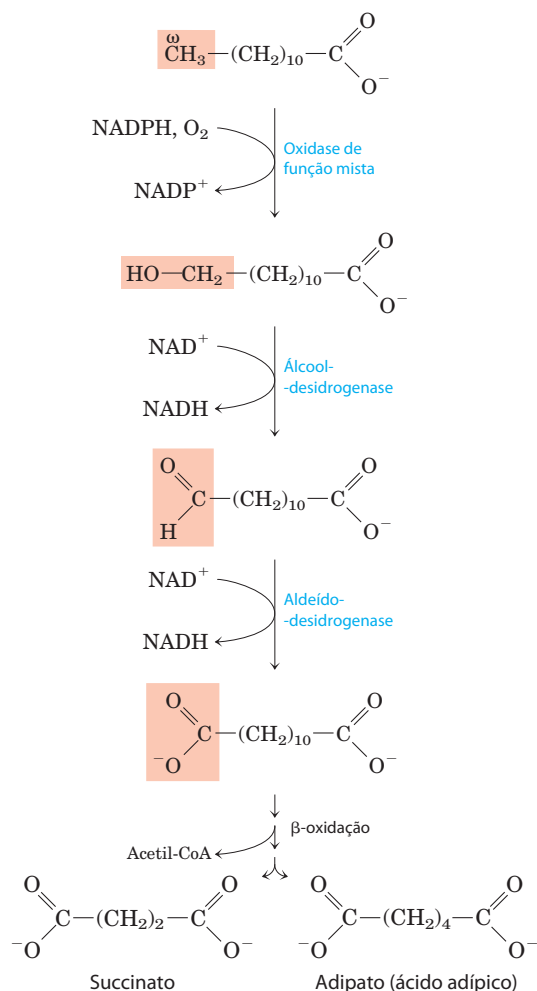



**FIGURA 17-17 A $\omega$-oxidação de ácidos graxos no retículo endoplasmático.** Esta alternativa à $\beta$-oxidação começa com a oxidação do carbono mais distante do carbono $\beta$ – o carbono $\omega$ (ômega). O substrato geralmente é um ácido graxo de cadeia média; o ácido láurico (laurato) é mostrado aqui. Essa via geralmente não é a principal via para o catabolismo oxidativo de ácidos graxos.

12 átomos de carbonos. Em mamíferos a $\omega$-oxidação é normalmente uma via minoritária para a degradação de ácidos graxos, mas quando a $\beta$-oxidação está defeituosa (p. ex., devido a uma mutação ou uma deficiência de carnitina) ela se torna mais importante.

A primeira etapa introduz um grupamento hidroxil no carbono $\omega$ (**Figura 17-17**). O oxigênio para esse grupamento vem do oxigênio molecular ($O_2$) em uma reação complexa que envolve o citocromo P450 e o doador de elétrons NADPH. As reações desse tipo são catalisadas pelas **oxidases de função mista**, descritas no Quadro 21-1. Agora, mais duas enzimas atuam sobre o carbono $\omega$: a **álcool-desidrogenase** oxida o grupamento hidroxil a um aldeído e a **aldeído-desidrogenase** oxida o grupamento aldeído a um ácido carboxílico, produzindo um ácido graxo com um grupo carboxil em cada extremidade. Neste ponto, as duas extremidades podem ser acopladas à coenzima A, e a molécula pode entrar na mitocôndria e sofrer $\beta$-oxidação pela via normal. Em cada passagem pela via de $\beta$-oxidação, o ácido graxo de "terminação dupla" gera ácidos dicarboxílicos, tal como o ácido succínico, que pode entrar no ciclo do ácido cítrico, e o ácido adípico (Figura 17-17).

## O ácido fitânico sofre $\alpha$-oxidação nos peroxissomos

A presença de um grupamento metil no carbono $\beta$ de um ácido graxo torna a $\beta$-oxidação impossível, e esses ácidos graxos ramificados são catabolizados nos peroxissomos de células animais por **$\alpha$-oxidação**. Na oxidação do ácido fitânico, por exemplo (**Figura 17-18**), o fitanoil-CoA é hidroxilado em seu carbono $\alpha$, em uma reação que envol-

Ácido fitânico — Fitanoil-CoA-sintetase (ATP, CoA-SH → AMP, $PP_i$) — Fitanoil-CoA — Fitanoil-CoA-hidroxilase ($\alpha$-Cetoglutarato, ascorbato, $Fe^{2+}$ → $CO_2$, succinato) — $\alpha$-Hidroxifitanoil-CoA — $\alpha$-hidroxifitanoil-CoA-liase (→ Formil-CoA → Ácido fórmico → $CO_2$) — Pristanal — Aldeído-desidrogenase (NAD(P)$^+$ → NAD(P)H) — Ácido pristânico — $\beta$-oxidação — 4,8,12-Trimetiltridecanoil-CoA + Propionil-CoA ($CH_3CH_2$—C(O)S-CoA)

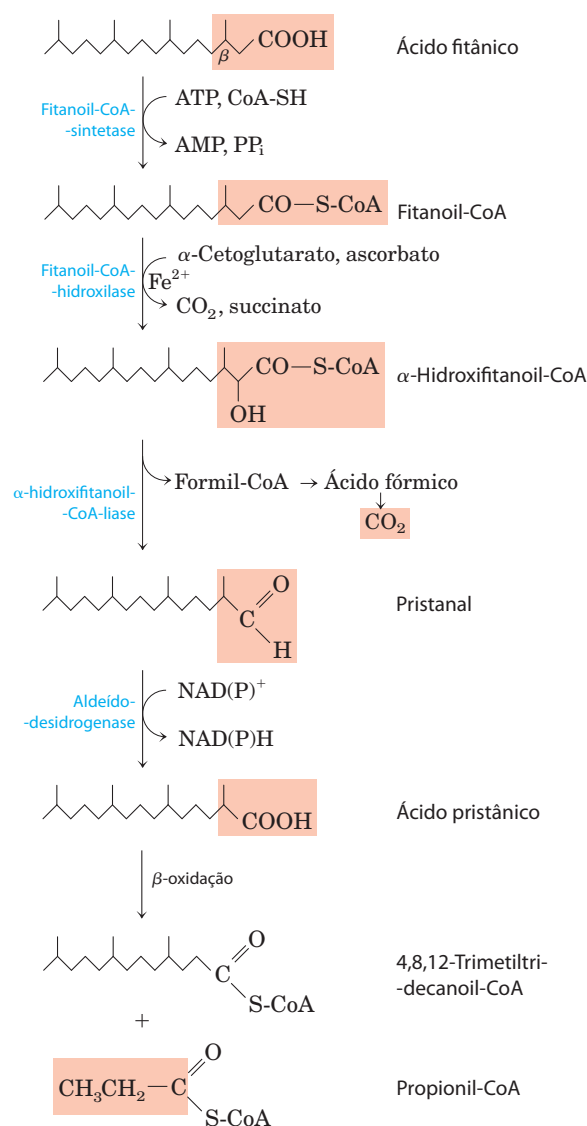



**FIGURA 17-18 A $\alpha$-oxidação de um ácido graxo de cadeia ramificada (ácido fitânico) nos peroxissomos.** O ácido fitânico tem um carbono $\beta$ com um substituinte metil e, portanto, não pode sofrer $\beta$-oxidação. A ação combinada das enzimas mostradas aqui remove o carbono do grupo carboxil do ácido fitânico para produzir ácido pristânico, no qual o carbono $\beta$ não está substituído, permitindo a $\beta$-oxidação. Observe que a $\beta$-oxidação do ácido pristânico libera propionil-CoA, e não acetil-CoA. Esta é posteriormente catabolizada como na Figura 17-12. (Os detalhes da reação que produz pristanal continuam controversos.)

ve oxigênio molecular; descarboxilado para formar um aldeído mais curto em um carbono; e então oxidado ao ácido carboxílico correspondente, que agora não tem nenhum substituinte no carbono $\beta$ e pode ser oxidado por $\beta$-oxidação. A **doença de Refsum**, resultante de um defeito genético na fitanoil-CoA-hidroxilase, leva a níveis sanguíneos muito elevados de ácido fitânio e problemas neurológicos severos, incluindo cegueira e surdez. ■

### RESUMO 17.2 Oxidação de ácidos graxos

- Na primeira etapa da $\beta$-oxidação, quatro reações retiram cada unidade de acetil-Coa da extremidade carboxila de um acil-CoA graxo saturado: (1) desidrogenação dos carbonos $\alpha$ e $\beta$ (C-2 e C-3) pelas acil-CoA-desidrogenases ligadas à FAD, (2) hidratação da dupla ligação *trans*-$\Delta^2$ resultante pela enoil-CoA-hidratase, (3) desidrogenação do L-$\beta$-hidroxiacil-CoA resultante pela $\beta$-hidroxiacil-CoA-desidrogenase ligada à NAD, e (4) clivagem por CoA do $\beta$-cetoacil-CoA resultante pela tiolase, para formar acetil-CoA e um acil-CoA graxo encurtado em dois carbonos. O acil-CoA graxo encurtado entra de novo na sequência de reações.
- Na segunda etapa da oxidação dos ácidos graxos, o acetil-Coa é oxidado a $CO_2$ no ciclo do ácido cítrico. Uma grande fração do rendimento teórico de energia livre da oxidação dos ácidos graxos é recuperada como ATP pela fosforilação oxidativa, a etapa final da via oxidativa.
- Malonil-CoA, intermediário inicial na síntese de ácidos graxos, inibe a carnitina-aciltransferase I, prevenindo a entrada dos ácidos graxos na mitocôndria. Isso bloqueia a degradação dos ácidos graxos enquanto ocorre a síntese.
- Defeitos genéticos na acil-CoA-desidrogenase de cadeia média resulta em doenças humanas graves, assim como mutações em outros componentes do sistema de $\beta$-oxidação.
- A oxidação de ácidos graxos insaturados requer duas enzimas adicionais: a enoil-CoA-isomerase e a 2,4-dienoil-CoA-redutase. Ácidos graxos de número ímpar são oxidados pela via de $\beta$-oxidação gerando acetil-Coa e uma molécula de propionil-CoA. Esta é carboxilada a metilmalonil-CoA, que é isomerizada a succinil-CoA em uma reação catalisada pela metilmalonil-CoA mutase, enzima que necessita de coenzima $B_{12}$.
- Os peroxissomos vegetais e animais, e os glioxissomos vegetais fazem $\beta$-oxidação em quatro etapas semelhantes àquelas da via mitocondrial em animais. A primeira etapa de oxidação, no entanto, transfere elétrons diretamente ao $O_2$, gerando $H_2O_2$. Os peroxissomos dos tecidos animais se especializam na oxidação de ácidos graxos de cadeia muito longa e em ácidos graxos ramificados. Nos glioxissomos, das sementes em germinação, a $\beta$-oxidação é um passo na conversão de lipídeos estocados em uma variedade de intermediários e produtos.
- As reações da $\omega$-oxidação, que ocorrem no retículo endoplasmático, produz intermediários acil-graxo dicarboxílicos, que podem sofrer $\beta$-oxidação em qualquer uma das extremidades para gerar ácidos dicarboxílicos curtos como o succinato.
- As reações da $\alpha$-oxidação degradam ácidos graxos ramificados, tal como o ácido fitânico.

## 17.3 Corpos cetônicos

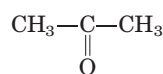
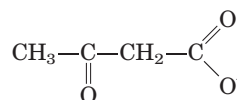
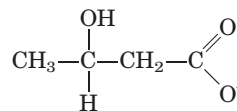
Em humanos, e na maior parte de outros mamíferos, o acetil-CoA formado no fígado durante a oxidação dos ácidos graxos pode entrar no ciclo do ácido cítrico (etapa 2 da Figura 17-7) ou sofrer conversão a "corpos cetônicos", **acetona**, **acetoacetato** e **D-$\beta$-hidroxibutirato**, para exportação a outros tecidos. (O termo "corpos" é um artefato histórico; esse termo é ocasionalmente aplicado a partículas insolúveis, mas esses compostos são solúveis no sangue e na urina.)

$CH_3$—C(=O)—$CH_3$

Acetona

$CH_3$—C(=O)—$CH_2$—$COO^-$

Acetoacetato

$CH_3$—CH(OH)—$CH_2$—$COO^-$

D-$\beta$-Hidroxibutirato

A acetona, produzida em menor quantidade do que os outros corpos cetônicos, é exalada. O acetoacetato e o D-$\beta$-hidroxibutirato são transportados pelo sangue para outros tecidos que não o fígado (tecidos extra-hepáticos), onde são convertidos a acetil-CoA e oxidados no ciclo do ácido cítrico, fornecendo muito da energia necessária para tecidos como o músculo esquelético e cardíaco e o córtex renal. O cérebro, que usa preferencialmente glicose como combustível, pode se adaptar ao uso de acetoacetato ou D-$\beta$-hidroxibutirato em condições de jejum prolongado, quando a glicose não está disponível. A produção e exportação dos corpos cetônicos do fígado para tecidos extra-hepáticos permite a oxidação contínua de ácidos graxos no fígado quando acetil-CoA não está sendo oxidada no ciclo do ácido cítrico.

### Os corpos cetônicos formados no fígado são exportados para outros órgãos como combustível

A primeira etapa na formação de acetoacetato, que ocorre no fígado (**Figura 17-19**), é a condensação enzimática de duas moléculas de acetl-CoA, catalisada pela tiolase; essa reação é simplesmente o inverso da última etapa da $\beta$-oxidação. O acetoacetil-CoA então se condensa com acetil-Coa formando **$\beta$-hidroxi-$\beta$-metilglutaril-CoA** (**HMG-CoA**), clivado a acetoacetato livre e acetil-Coa. O acetoacetato é reversivelmente reduzido pela D-$\beta$-hidroxibutirato-desidrogenase, uma enzima mitocondrial, a D-$\beta$-hidroxibutirato. Essa enzima é específica para o estereoisômero D; ela não atua sobre L-$\beta$-hidroxiacil-CoAs e não

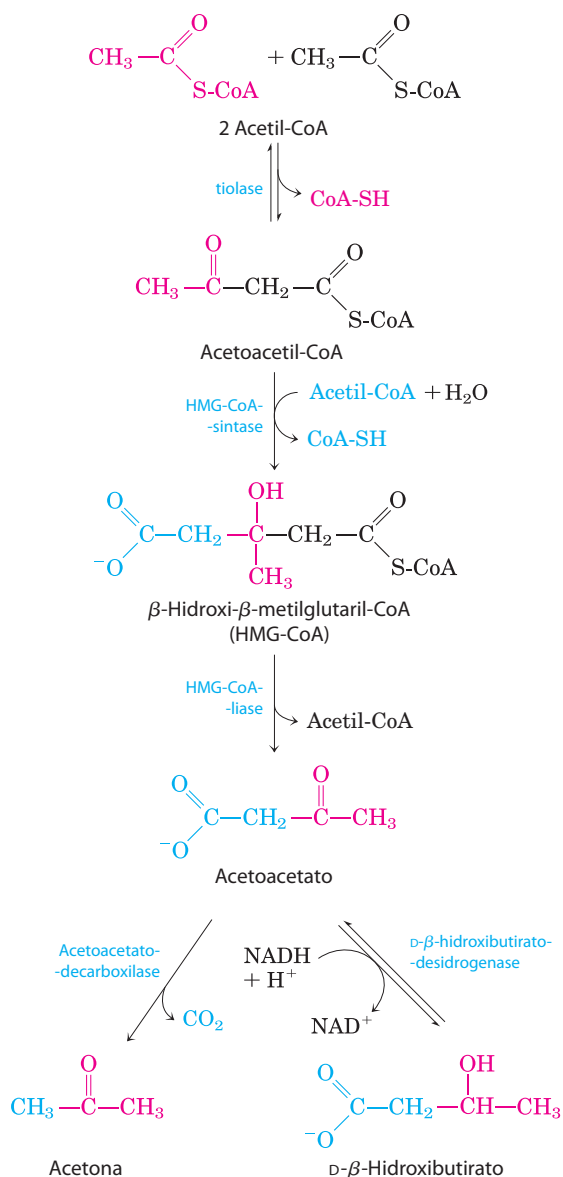



**FIGURA 17-19 Formação de corpos cetônicos a partir de acetil-CoA.** Pessoas saudáveis e bem nutridas produzem corpos cetônicos a uma taxa relativamente baixa. Quando a acetil-CoA se acumula (p. ex., como no jejum prolongado ou diabetes não tratado), a tiolase catalisa a condensação de duas moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA, o composto que origina os três corpos cetônicos. As reações da formação de corpos cetônicos ocorrem na matriz das mitocôndrias do fígado. O composto de seis carbonos $\beta$-hidroxi-$\beta$-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) também é um intermediário da biossíntese de esteróis, mas a enzima que forma HMG-CoA naquela via é citosólica. A HMG-CoA-liase está presente somente na matriz mitocondrial.

deve ser confundida com a L-$\beta$-hidroxiacil-CoA-desidrogenase da via de $\beta$-oxidação.

Em pessoas saudáveis, a acetona é formada em quantidade muito pequena a partir de acetoacetato, que é facilmente descarboxilado espontaneamente ou pela ação da **acetoacetato-descarboxilase** (Figura 17-19). Como pessoas com diabetes não tratado produzem grandes quantidades de acetoacetato, seu sangue contém quantidades significativas de acetona, que é tóxica. A acetona é volátil e provoca um odor característico ao hálito, que algumas vezes é útil no diagnóstico da diabetes. ■

Em tecidos extra-hepáticos, o D-$\beta$-hidroxibutirato é oxidado a acetoacetato pela D-$\beta$-hidroxibutirato-desidrogenase (**Figura 17-20**). O acetoacetato é ativado ao seu éster de coenzima A pela transferência da CoA do succinil-CoA, intermediário do ciclo do ácido cítrico (ver Figura 16-7), em uma reação catalisada pela **$\beta$-cetoacil-CoA-transferase**, também chamada tioforase. O acetoacetil-CoA é então clivado pela tiolase gerando dois acetil-CoAs, que entram no ciclo do ácido cítrico. Assim, os corpos cetônicos são usados como combustível em todos os tecidos, exceto o fígado, que carece de tioforase. O fígado é, consequentemente, um produtor de corpos cetônicos para os outros tecidos, mas não um consumidor.

A produção e exportação dos corpos cetônicos pelo fígado permite a oxidação contínua de ácidos graxos com mínima oxidação de acetil-CoA. Quando os intermediários do ciclo do ácido cítrico são desviados para a síntese de glicose pela gliconeogênese, por exemplo, a oxidação dos intermediários do ciclo desacelera – bem como a oxidação de acetil-CoA. Além disso, o fígado contém apenas uma quantidade limitada de coenzima A, e quando a maior parte está comprometida com acetil-CoA, a $\beta$-oxidação desacelera esperando por coenzima livre. A produção e a exportação de corpos cetônicos liberam a coenzima A, permitindo a contínua oxidação dos ácidos graxos.

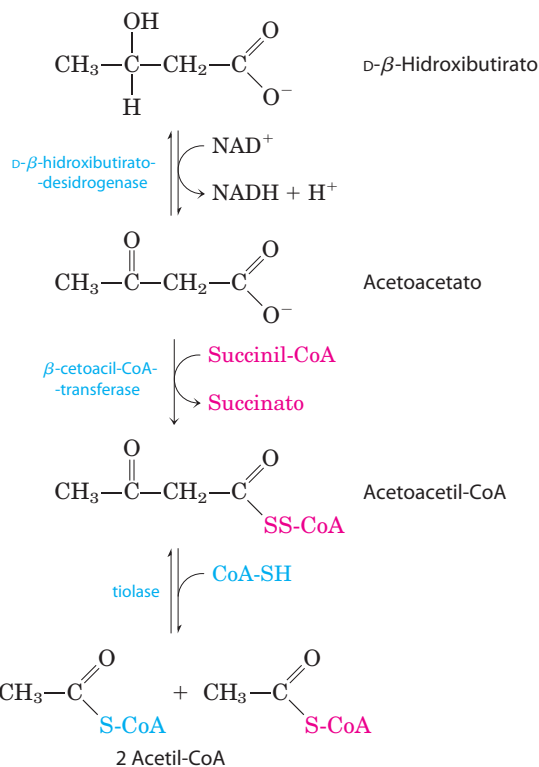



**FIGURA 17-20 D-$\beta$-Hidroxibutirato como combustível.** O D-$\beta$-Hidroxibutirato, sintetizado no fígado, passa para o sangue e, portanto, para outros tecidos, onde é convertido a acetil-CoA em três passos. Ele é primeiro oxidado a acetoacetato, que é ativado com a coenzima A doada pela succinil-CoA, e então clivado pela tiolase. A acetil-CoA assim formada é utilizada para a produção de energia.

## Os corpos cetônicos são produzidos em excesso no diabetes e durante o jejum

Jejum e diabetes melito não tratado leva à superprodução de corpos cetônicos, com vários problemas médicos associados. Durante o jejum, a gliconeogênese consome os intermediários do ciclo do ácido cítrico, desviando acetil-CoA para a produção de corpos cetônicos (**Figura 17-21**). No diabetes não tratado, quando o nível de insulina é insuficiente, os tecidos extra-hepáticos não podem captar a glicose do sangue de maneira eficiente, para combustível ou para conservação como gordura. Nessas condições, os níveis de malonil-CoA (o material de início para a síntese de ácidos graxos) caem, a inibição da carnitina-aciltransferase I é aliviada, e os ácidos graxos entram na mitocôndria para ser degradado a acetil-CoA – que não pode passar pelo ciclo do ácido cítrico, já que os intermediários do ciclo foram drenados para uso como substrato na gliconeogênese. O acúmulo resultante de acetil-CoA acelera a formação de corpos cetônicos além da capacidade de oxidação dos tecidos extra-hepáticos. O aumento dos níveis sanguíneos de acetoacetato e D-$\beta$-hidroxibutirato diminui o pH do sangue, causando a condição conhecida como **acidose**. A acidose extrema pode levar ao coma e em alguns casos à morte. Os corpos cetônicos no sangue e na urina de indivíduos com diabetes não tratado pode alcançar níveis extraordinários – uma concentração sanguínea de 90 mg/mL (comparado com o nível normal de $<$ 3 mg/100 mL) e excreção urinária de 5.000 mg/24h (comparado com uma taxa normal de $\leq$125 mg/24h). Essa condição é chamada **cetose**.

Indivíduos em dietas hipocalóricas, utilizando as gorduras armazenadas no tecido adiposo como sua principal fonte de energia, também têm níveis elevados de corpos cetônicos no sangue e na urina. Esses níveis devem ser monitorados para evitar os riscos da acidose e da cetose (cetoacidose).

**FIGURA 17-21 Formação de corpos cetônicos e exportação a partir do fígado.** As condições que promovem a gliconeogênese (diabetes não tratado, redução na ingestão de alimento) desaceleram o ciclo do ácido cítrico (pelo consumo do oxaloacetato) e aumentam a conversão de acetil-CoA em acetoacetato. A coenzima A liberada permite a $\beta$-oxidação contínua de ácidos graxos.

## RESUMO 17.3 Corpos cetônicos

- Os corpos cetônicos – acetona, acetoacetato e D-$\beta$-hidroxibutirato – são formados no fígado. Os dois últimos compostos servem como combustíveis nos tecidos extra-hepáticos, por meio da oxidação a acetil-CoA e entrada no ciclo do ácido cítrico.
- A superprodução de corpos cetônicos no diabetes não controlado ou na redução severa da ingestão de calorias pode levar à acidose ou cetose.

## Termos-chave

*Os termos em negrito estão definidos no glossário.*

**$\beta$-oxidação** 667
**quilomícron** 669
**apolipoproteína** 669
**lipoproteína** 669
perilipina 669
ácidos graxos livres 669
albumina sérica 669
**ciclo da carnitina** 670
carnitina-aciltransferase I 671
transportador-acil-carnitina/carnitina 671
carnitina-aciltransferase II 671
proteína trifuncional (TFP) 674
metilmalonil-CoA-mutase 678
**coenzima $B_{12}$** 678
malonil-CoA 679
**PPAR (receptor ativado por proliferadores de peroxissomos)** 679
anemia perniciosa 681
fator intrínseco 681
acil-CoA-desidrogenase de cadeia média (MCAD) 682
proteína multifuncional (MFP) 684
**$\omega$-oxidação** 684
**oxidases de função mista** 685
**$\alpha$-oxidação** 685
**acidose** 688
**cetose** 688

## Leituras adicionais

### Gerais

**Boyer, P.D.** (1983) *The Enzymes*, 3rd edn, Vol. 16: *Lipid Enzymology*, Academic Press, Inc., San Diego, CA.

**Ferry, G.** (1998) *Dorothy Hodgkin: A Life*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
Biografia fascinante de uma mulher surpreendente.

**Gurr, M.I., Harwood, J.L., & Frayn, K.N.** (2002) *Lipid Biochemistry: An Introduction*, 5th edn, Blackwell Science, Oxford, UK.

**Plutzky, J.** (2009) The mighty mighty fatty acid. *Nat. Med.* **15**, 618–619.

**Scheffler, I.E.** (1999) *Mitochondria*, Wiley-Liss, New York.
Excelente obra sobre a estrutura e a função mitocondriais.

**Wood, P.A.** (2006) *How Fat Works*, Harvard University Press, Cambridge, MA.
Relato muito legível, de nível intermediário, sobre as contribuições da genética e de modelos murinos para a compreensão do metabolismo lipídico e obesidade.

## Digestão, mobilização e transporte de gorduras

**Farese, R.V., Jr., & Walther, T.C.** (2009) Lipid droplets finally get a little r-e-s-p-e-c-t. *Cell* **139**, 855–860.

**Glatz, J.F.C., Luiken, J.J.F.P., & Bonen, A.** (2010) Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol. Rev.* **90**, 367–417.

**Greenberg, A.S. & Coleman, R.A.** (2011) Expanding roles for lipid droplets. *Trends Endocrinol. Metab.* 22, 195–196.

Introdução editorial a um número desse periódico dedicado a gotas de lipídeo.

**Langin, D., Holm, C., & Lafontan, M.** (1996) Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* **55**, 93–109.

**Ramsay, T.G.** (1996) Fat cells. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* **25**, 847–870.

Uma revisão de todos os aspectos do armazenamento e mobilização de gordura nos adipócitos.

**Reue, K.** (2011) A thematic review series: lipid droplet storage and metabolism: from yeast to man. *J. Lipid Res.* **52**, 1865–1868.

Uma introdução editorial a uma série de artigos sobre gotas lipídicas publicadas nessa edição.

**Shaw, C.S., Clark, J., & Wagenmakers, A.J.M.** (2010) The effect of exercise and nutrition on intramuscular fat metabolism and insulin sensitivity. *Annu. Rev. Nutr.* **30**, 13–34.

**Steinberg, G.R.** (2009) Role of the AMP-activated protein kinase in regulating fatty acid metabolism during exercise. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **34**, 315–322.

**Storch, J. & Rhumsey, A.D.** (2010) Tissue-specific functions in the fatty acidbinding protein family (minireview) *J. Biol. Chem.* **285**, 32,679–32,683.

**Wang, C.S., Hartsuck, J., & McConathy, W.J.** (1992) Structure and functional properties of lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Acta* **1123**, 1–17.

Uma discussão em nível avançado sobre as enzimas ácidos graxos das lipoproteínas nos capilares do tecido muscular e adiposo.

**Watt, M.J. & Steinberg, G.R.** (2008) Regulation and function of triacylglycerol lipases in cellular metabolism. *Biochem. J.* **414**, 313–325.

**Zechner, R., Kienesberger, P.C., Haemmerle, G., Zimmermann R., & Lass, A.** (2009) Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J. Lipid Res.* **50**, 3–21.

## β-oxidação mitocondrial

**Bannerjee, R.** (1997) The yin-yang of cobalamin biochemistry. *Chem. Biol.* **4**, 175–186.

Revisão sobre a bioquímica das reações da coenzima $B_{12}$, incluindo a reação da metilmalonil-CoA-mutase.

**Carey, H.V., Andrews, M.T., & Martin, S.L.** (2003) Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol. Rev*. **83**, 1153–1181.

**Desverne, B., Michalik, L., & Wahij, W.** (2006) Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* **86**, 465–514.

Ampla revisão sobre a regulação do metabolismo, incluindo o metabolismo das gorduras por fatores de transcrição.

**Eaton, S., Bartlett, K., & Pourfarzam, M.** (1996) Mammalian mitochondrial β-oxidation. *Biochem. J.* **320**, 345–357.

Revisão sobre a enzimologia da β-oxidação, defeitos hereditários nessa via, e regulação do processo na mitocôndria.

**Eaton, S., Bursby, T., Middleton, B., Pourfarzam, M., Mills, K., Johnson, A.W., & Bartlett, K.** (2000) The mitochondrial trifunctional protein: centre of a β-oxidation metabolon? *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 177–182.

Breve revisão de nível intermediário.

**Evans, R.M., Barish, G.D., & Wang, Y.-X.** (2004) PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med.* **10**, 1–7.

Revisão de leitura fácil, de nível intermediário, sobre a descoberta dos PPAR e suas funções.

**Harwood, J.L.** (1988) Fatty acid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 101–138.

**Jeukendrup, A.E., Saris, W.H., & Wagenmakers, A.J.** (1998) Fat metabolism during exercise: a review. Part III: effects of nutritional interventions. *Int. J. Sports Med*. **19**, 371–379.

Este artigo faz parte de uma série que revisa os fatores que influenciam a mobilização de gordura e sua utilização durante o exercício.

**Kampf, J.P. & Kleinfeld, A.M.** (2007) Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? *Physiology* **22**, 7–14.

**Kerner, J. & Hoppel, C.** (1998) Genetic disorders of carnitine metabolism and their nutritional management. *Annu. Rev. Nutr.* **18**, 179–206.

**Kerner, J. & Hoppel, C.** (2000) Fatty acid import into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1486**, 1–17.

**Kunau, W.H., Dommes, V., & Schulz, H.** (1995) β-Oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog. Lipid Res.* **34**, 267–342.

Bom artigo histórico e comparação útil da β-oxidação em diferentes sistemas.

**Mandard, S., Muller, M., & Kersten, S.** (2004) Peroxisome proliferatoractivated receptor alpha target genes. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 393–416.

Revisão dos genes controlados por PPARα.

**Rinaldo, P., Matern, D., & Bennett, M.J.** (2002) Fatty acid oxidation disorders. *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 477–502.

Revisão avançada dos defeitos metabólicos na oxidação de gorduras, incluindo mutações em MCAD.

**Rufer, A.C., Thoma, R., Benz, J., Stihle, M., Gsell, B., De Roo, E., Banner, D.W., Mueller, F., Chomienne, O., & Hennig, M.** (2006) The crystal structure of carnitine palmitoyltransferase 2 and implications for diabetes treatment. *Structure* **14**, 713–723.

**Sherratt, H.S.** (1994) Introduction: the regulation of fatty acid oxidation in cells. *Biochem. Soc. Trans.* **22**, 421–422.

Introdução a revisões nesta edição da revista sobre vários aspectos da oxidação dos ácidos graxos e sua regulação.

**Thorpe, C. & Kim, J.J.** (1995) Structure and mechanism of action of the acyl-CoA dehydrogenases. *FASEB J.* **9**, 718–725.

Descrição curta e clara da estrutura tridimensional e mecanismo catalítico destas enzimas.

## β-oxidação peroxissomal

**Graham, I.A. & Eastmond, P.J.** (2002) Pathways of straight and branched chain fatty acid catabolism in higher plants. *Prog. Lipid Res*. **41**, 156–181.

**Wanders, R.J.A., van Grunsven, E.G., & Jansen, G.A.** (2000) Lipid metabolism in peroxisomes: enzymology, functions and dysfunctions of the fatty acid α- and β-oxidation systems in humans. *Biochem. Soc. Trans*. **28**, 141–148.

## Corpos cetônicos

**Foster, D.W. & McGarry, J.D.** (1983) The metabolic derangements and treatment of diabetic ketoacidosis. *N. Engl. J. Med.* **309**, 159–169.

**McGarry, J.D. & Foster, D.W.** (1980) Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 395–420.

**Robinson, A.M. & Williamson, D.H.** (1980) Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol. Rev.* **60**, 143–187.

## Problemas

**1. Energia em triacilgliceróis.** Tendo como base "por átomo de carbono", onde reside a maior quantidade de energia biologicamente disponível nos triacilgliceróis: na porção ácido graxo ou na porção glicerol? Indique como o conhecimento da estrutura química dos triacilgliceróis fornece a resposta.

**2. Reservas de combustíveis no tecido adiposo.** Triacilgliceróis, com seus ácidos graxos semelhantes a hidrocarbonetos, têm o maior conteúdo de energia entre os principais nutrientes.

(a) Se 15% da massa corporal de um adulto de 70 Kg consistem em triacilgliceróis, qual é o total de reserva de combustível disponível, em quilojoules e em quilocalorias, na forma de triacilgliceróis? Lembre-se que 1,0 kCal = 4,18 kJ.

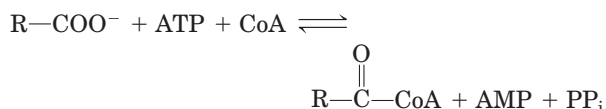
(b) Se a necessidade energética basal é aproximadamente 8.400 kJ/dia (2.000 kCal/dia), por quanto tempo essa pessoa sobreviveria se a oxidação dos ácidos graxos armazenados como triacilgliceróis fosse a única fonte de energia?

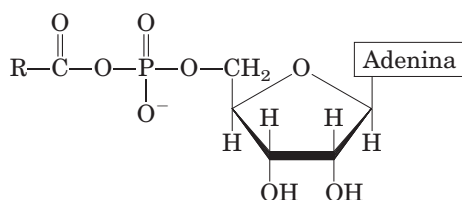
(c) Qual seria a perda de peso em libras por dia sob essa condição de jejum (1 lb = 0,545 kg)?

**3. Etapas reacionais comuns ao ciclo de oxidação dos ácidos graxos e o ciclo do ácido cítrico.** Muitas vezes, as células usam o mesmo perfil de reações enzimáticas para conversões metabólicas análogas. Por exemplo, as etapas da oxidação de piruvato a acetil-CoA e do $\alpha$-cetoglutarato a succinil-CoA, embora catalisada por enzimas diferentes, são muito semelhantes. O primeiro estágio da oxidação dos ácidos graxos segue uma sequência reacional muito semelhante a uma sequência do ciclo do ácido cítrico. Use equações para mostrar as sequências de reações análogas nas duas vias.

**4. $\beta$-Oxidação: quantos ciclos?** Quantos ciclos de $\beta$-oxidação são necessários para a completa oxidação do ácido oleico ativado, 18:1($\Delta^9$)?

**5. Química da reação da acil-CoA-sintetase.** Os ácidos graxos são convertidos aos seus ésteres de coenzima A em uma reação reversível catalisada pela acil-CoA-sintetase:

$$R{-}COO^- + ATP + CoA \rightleftharpoons R{-}\overset{\overset{\large O}{\|}}{C}{-}CoA + AMP + PP_i$$

(a) O intermediário ligado à enzima nessa reação foi identificado como o anidrido misto do ácido graxo e o monofosfato de adenosina (AMP), acil-AMP:

$$R{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}{-}O{-}\underset{\underset{O^-}{|}}{\overset{\overset{O}{\|}}{P}}{-}O{-}CH_2$$ (ribose com OH, OH e Adenina)

Escreva duas equações correspondentes às duas etapas da reação catalisada pela acil-CoA-sintetase.

(b) A reação da acil-CoA-sintetase é prontamente reversível, com uma constante de equilíbrio próxima de 1. Como essa reação pode ser feita para favorecer a formação de acil-CoA graxo?

**6. Intermediários da oxidação do ácido oleico.** Qual é a estrutura do grupo acil-graxo parcialmente oxidado que é formado quando ácido oleico, 18:1($\Delta^9$) sofre três ciclos de $\beta$-oxidação? Quais são as duas etapas seguintes na continuação da oxidação desse intermediário?

**7. $\beta$-oxidação de um ácido graxo de cadeia ímpar.** Qual é o produto direto da $\beta$-oxidação de um ácido graxo completamente saturado de 11 carbonos?

**8. Oxidação do palmitato tritiado.** O palmitato marcado uniformemente com trítio ($^3$H), a uma atividade específica de 2,48 $\times$ 10$^8$ contagens por minuto (cpm) por micromol de palmitato, é adicionado a uma preparação mitocondrial que o oxida a acetil-CoA. A acetil-Coa é isolada e hidrolisada a acetato. A atividade específica do acetato isolado é 1,0 $\times$ 10$^7$ cpm/$\mu$mol. Esse resultado é consistente com a via de $\beta$-oxidação? Explique. Qual é o destino final do trítio removido?

**9. Compartimentalização da $\beta$-oxidação.** Palmitato livre é ativado ao seu derivado de coenzima A (palmitoil-CoA) no citosol antes de ser oxidado na mitocôndria. Se palmitato e coenzima A [$^{14}$C] são adicionados a um homogenato de fígado, palmitoil-CoA isolado da fração citosólica será radioativo, mas o isolado da fração mitocondrial não. Explique.

**10. Bioquímica comparativa: vias geradoras de energia em pássaros.** Uma indicação da importância relativa das várias vias produtoras de ATP é a $V_{máx}$ de certas enzimas dessas vias. Os valores de $V_{máx}$ de várias enzimas dos músculos peitorais (músculo do peito usado para voar) de pombo e faisão estão listados abaixo.

| | $V_{máx}$ ($\mu$mol substrato/min/g de tecido) | |
|---|---|---|
| **Enzima** | **Pombo** | **Faisão** |
| Hexocinase | 3,0 | 2,3 |
| Glicogênio-fosforilase | 18,0 | 120,0 |
| Fosfofrutocinase-1 | 24,0 | 143,0 |
| Citrato-sintase | 100,0 | 15,0 |
| Triacilglicerol-lipase | 0,07 | 0,01 |

(a) Discuta a importância relativa do metabolismo do glicogênio e das gorduras na geração de ATP nos músculos peitorais desses pássaros.

(b) Compare o consumo de oxigênio nos dois pássaros.

(c) A julgar pelos dados na tabela, qual pássaro é voador de longas distâncias? Justifique sua resposta.

(d) Por que essas enzimas em particular foram selecionadas para a comparação? As atividades da triose fosfato e da malato-desidrogenase seriam igualmente boas para comparação? Explique.

**11. Carnitina-aciltransferase mutante.** O que muda no perfil metabólico resultante de uma mutação na carnitina-aciltransferase I muscular, em que a proteína mutante perdeu sua afinidade por malonil-CoA, mas não sua atividade catalítica?

**12. Efeito da deficiência de carnitina.** Um indivíduo desenvolveu uma condição caracterizada por fraqueza muscular progressiva e dolorosas câimbras musculares. Os sintomas foram agravados durante o jejum, exercício e dieta rica em gordura. O homogenato de uma amostra de músculo esquelético do paciente oxida oleato mais lentamente do que homogenatos controle, consistindo de amostras de músculo de indivíduos sadios. Quando carnitina foi adicionada ao homogenato de músculo do paciente, a taxa de oxidação do oleato se igualou a dos homogenatos controle. O paciente foi diagnosticado como portador de uma deficiência de carnitina.

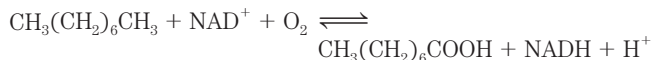
(a) Por que a carnitina adicionada aumenta a taxa de oxidação do oleato no homogenato de músculo do paciente?

(b) Por que os sintomas do paciente se agravaram durante o jejum, o exercício e em dieta rica em gordura?

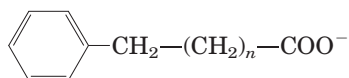
(c) Sugira duas razões possíveis para a deficiência de carnitina muscular desse indivíduo.

**13. Os ácidos graxos como fonte de água.** Ao contrário da lenda, os camelos não armazenam água em suas corcovas, que consistem na verdade em um grande depósito de gordura. Como esses depósitos de gorduras podem servir de fonte de água? Calcule a quantidade de água (em litros) que o camelo pode produzir a partir de 1,0 kg de gordura. Assuma, para simplificação, que a gordura é totalmente formada por tripalmitoilglicerol.

**14. Petróleo como fonte de alimento para micróbios.** Alguns microrganismos do gênero *Nocardia* e *Pseudomonas* podem crescer em um ambiente em que hidrocarbonetos são as únicas fontes de energia. Essas bactérias oxidam hidrocarbonetos alifáticos de cadeia linear, tal como octano, aos seus ácidos carboxílicos correspondentes:

$$CH_3(CH_2)_6CH_3 + NAD^+ + O_2 \rightleftharpoons CH_3(CH_2)_6COOH + NADH + H^+$$

Como essas bactérias poderiam ser usadas para limpeza de derramamento de óleo? O que seriam os fatores limitantes na eficiência desse processo.

**15. Metabolismo de um ácido graxo prenilado de cadeia linear.** Um metabólito cristalino foi isolado da urina de um coelho que foi alimentado com dieta contendo um ácido graxo de cadeia linear com um grupo fenil terminal:

$$C_6H_5{-}CH_2{-}(CH_2)_n{-}COO^-$$

Uma amostra de 302 mg do metabólito em solução aquosa foi completamente neutralizada com 22,2 mL de NaOH 0,100 M.

(a) Qual é a provável massa molecular e estrutura do metabólito?

(b) O ácido graxo de cadeia linear tinha um número par ou ímpar de grupos metilenos ($-CH_2-$) (ou seja, $n$ é par ou ímpar)? Explique.

**16. A oxidação de ácidos graxos em diabetes não controlado.** Quando o acetil-CoA produzido durante a $\beta$-oxidação no fígado excede a capacidade do ciclo do ácido cítrico, o excesso de acetil-CoA forma corpos cetônicos – acetona, acetoacetato e D-$\beta$-hidroxibutirato. Isso ocorre em diabetes grave não controlada: já que os tecidos não podem usar glicose, eles oxidam grandes quantidades de ácidos graxos. Apesar de acetil-CoA não ser tóxico, a mitocôndria deve desviar o acetil-CoA em corpos cetônicos. Qual problema surgiria se acetil-CoA não fosse convertido a corpos cetônicos? Como o desvio a corpos cetônicos soluciona esse problema?

**17. Consequências de uma dieta rica em gordura sem carboidratos.** Suponha que você tivesse que sobreviver com uma dieta de gordura de baleia e foca, com pouco ou sem carboidrato.

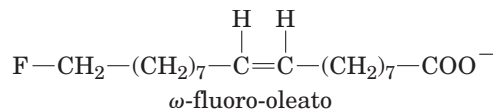
(a) Qual seria o efeito da privação de carboidrato na utilização de gordura para energia?

(b) Se a sua dieta fosse completamente ausente de carboidratos, seria melhor consumir ácidos graxos de cadeia par ou ímpar? Explique.

**18. Ácidos graxos de cadeia par e ímpar na dieta.** Em um experimento laboratorial, dois grupos de ratos foram alimentados com dois tipos de ácidos graxos diferentes como única fonte de carbono por um mês. O primeiro grupo recebeu ácido heptanoico (7:0), e o segundo recebeu ácido octanoico (8:0). Após o experimento, uma notável diferença foi percebida entre os dois grupos. Aqueles do primeiro grupo estão saudáveis e ganharam peso, enquanto aqueles do segundo grupo estão fracos e perderam peso, como resultado da perda de massa muscular. Qual é a base bioquímica para essa diferença?

**19. Consequências metabólicas da ingestão de $\omega$-fluoro-oleato.** O arbusto *Dichapetalum toxicarium*, nativo de Serra Leoa, produz $\omega$-fluoro-oleato, altamente tóxico para animais de sangue quente.

$$F{-}CH_2{-}(CH_2)_7{-}\overset{H}{C}{=}\overset{H}{C}{-}(CH_2)_7{-}COO^-$$

$\omega$-fluoro-oleato

Essa substância tem sido utilizada como veneno de flecha, e a polpa desidratada do fruto dessa planta é usada algumas vezes como veneno de rato (daí o nome comum da planta: *ratsbane*). Por que essa substância é tão tóxica? (Dica: revise o Capítulo 16, Problema 22).

**20. Mutação da acetil-CoA-carboxilase.** Quais seriam as consequências para o metabolismo das gorduras a mutação na acetil-CoA-carboxilase que substitui o resíduo de Ser normalmente fosforilado pela AMPK por um resíduo de Ala? O que aconteceria se a mesma Ser fosse substituída por Asp? (Dica: consulte Figura 17-13).

**21. Efeito dos inibidores de PDE sobre os adipócitos.** Como seria afetada a resposta de um adipócito a adrenalina pela adição de um inibidor de cAMP-fosfodiesterase (PDE)? (Dica: consulte Figura 12-4).

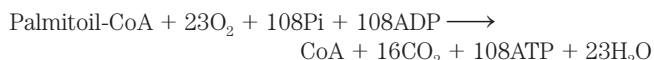
**22. Função do FAD como aceptor de elétrons.** A acil-CoA-desidrogenase utiliza FAD ligado à enzima como grupo prostético para desidrogenar os carbonos $\alpha$ e $\beta$ do acil-graxo-CoA. Qual é a vantagem de usar FAD como aceptor de elétrons em vez de $NAD^+$? Explique em termos dos potenciais de redução padrão para as semirreações: Enz-FAD/$FADH_2$ ($E'° = -0{,}219$ V) e $NAD^+$/NADH ($E'° = -0{,}320$ V).

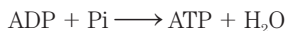
**23. $\beta$-oxidação do ácido araquidônico.** Quantas voltas do ciclo de oxidação dos ácidos graxos são necessárias para a oxidação completa do ácido araquidônico (ver Tabela 10-1) a acetil-CoA?

**24. Destino do propionato marcado.** Se [3-$^{14}$C]propionato ($^{14}$C no grupo metila) é adicionado a um homogenato de fígado, $^{14}$C-oxaloacetato é produzido rapidamente. Desenhe um fluxograma para a via pelo qual propionato é transformado em oxaloacetato, e indique a localização do $^{14}$C no oxaloacetato.

**25. Metabolismo do ácido fitânico.** Quando um rato é alimentado com ácido fitânico uniformemente marcado com $^{14}$C, em poucos minutos a radioatividade pode ser detectada no malato, intermediário do ciclo do ácido cítrico. Desenhe uma via metabólica que poderia explicar isso. Quais dos átomos de carbono no malato conteria a marcação $^{14}$C?

**26. Fontes de $H_2O$ produzidas na $\beta$-oxidação.** A oxidação completa do palmitoil-CoA a dióxido de carbono e água está representada pela equação geral

$$\text{Palmitoil-CoA} + 23O_2 + 108\text{Pi} + 108\text{ADP} \longrightarrow \text{CoA} + 16CO_2 + 108\text{ATP} + 23H_2O$$

A água também é produzida na reação

$$\text{ADP} + \text{Pi} \longrightarrow \text{ATP} + H_2O$$

mas não está incluída como produto na equação global. Por quê?

**27. Importância biológica do cobalto.** Em gado, veado, ovelha e em outros animais ruminantes, são formadas grandes quantidades de propionato no rúmen por meio da fermentação bacteriana da matéria vegetal ingerida. O propionato é a principal fonte de glicose para esses animais, pela rota: propionato $\longrightarrow$ oxaloacetato $\longrightarrow$ glicose. Em algumas áreas do mundo, principalmente na Austrália, os animais ruminantes algumas vezes mostram sintomas de anemia com concomitante perda de apetite e retardo no crescimento, resultantes da inabilidade de transformar propionato em oxaloacetato. Essa condição é devido à deficiência de cobalto causada por níveis muito baixos de cobalto no solo e por consequência na matéria vegetal. Explique.

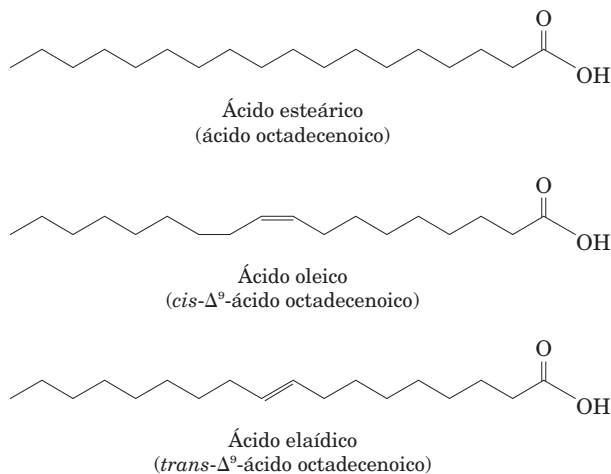
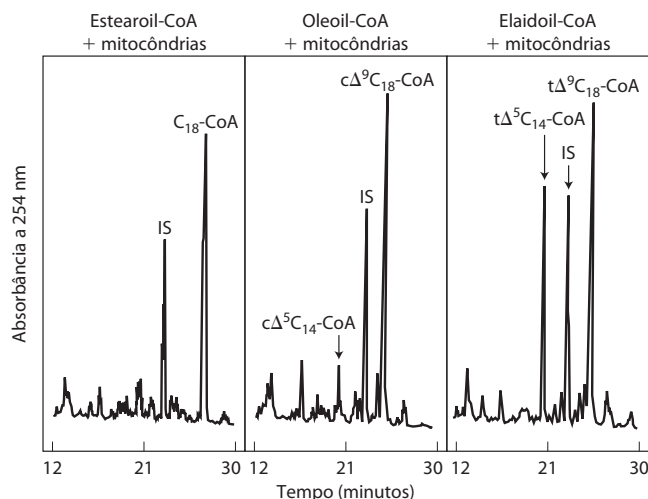
**28. Perda de gordura durante hibernação.** Os ursos consomem cerca de $25 \times 10^6$ J/dia durante períodos de hibernação, que podem durar até sete meses. A energia necessária para sustentar a vida é obtida da oxidação de ácidos graxos. Quanta perda de peso (em quilogramas) ocorre após sete meses? Como a cetose pode ser minimizada durante a hibernação? (Assuma que a oxidação de gorduras rende 38 kJ/g).

## Problema de análise de dados

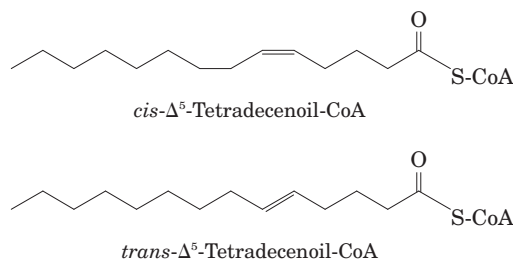
**29. $\beta$-oxidação de gorduras *trans*.** Gorduras insaturadas com ligações duplas *trans* são comumente conhecidas como "gordura *trans*". Tem havido muita discussão acerca dos efeitos das gorduras *trans* da dieta na saúde. Em seus trabalhos sobre os efeitos do metabolismo dos ácidos graxos *trans* sobre a saúde, Yu e colaboradores (2004) mostraram que um ácido graxo *trans* modelo foi processado diferentemente do seu isômero *cis*. Eles usaram três ácidos gaxos relacionados de 18 carbonos para explorar a diferença na $\beta$-oxidação entre os isômeros *cis* e *trans* dos ácidos graxos de mesmo tamanho.

O
OH
Ácido esteárico
(ácido octadecenoico)

O
OH
Ácido oleico
(*cis*-$\Delta^9$-ácido octadecenoico)

O
OH
Ácido elaídico
(*trans*-$\Delta^9$-ácido octadecenoico)

Os pesquisadores incubaram os derivados de coenzima A de cada ácido com mitocôndria hepática de rato por 5 minutos, e então separam os derivados de CoA remanescente em cada mistura por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência). Os resultados estão mostrados abaixo, com painéis separados para os três experimentos.

Nesta figura, PI indica um padrão interno (pentadecanoil-CoA) adicionado à mistura, após a reação, como marcador molecular. Os pesquisadores abreviaram os derivados de CoA como segue: estearoil-CoA, $C_{18}$-CoA; *cis*-$\Delta^5$-tetradecenoil-CoA, *cis*-$\Delta^5C_{14}$-CoA; oleoil-CoA, *cis*-$\Delta^9C_{18}$-CoA; *trans*-$\Delta^5$-tetradecenoil-CoA, *trans*-$\Delta^5C_{14}$-CoA; e elaidoil-CoA, *trans*-$\Delta^9C_{18}$-CoA.

O
S-CoA
*cis*-$\Delta^5$-Tetradecenoil-CoA

O
S-CoA
*trans*-$\Delta^5$-Tetradecenoil-CoA

(a) Por que Yu e colaboradores precisaram usar derivados de CoA em vez de usar os ácidos graxos livre nesses experimentos?

(b) Por que não foram encontrados derivados de CoA de peso molecular mais baixo na reação com estearoil-CoA?

(c) Quantas voltas de $\beta$-oxidação seriam necessárias para converter o oleoil-CoA e o elaidoil-CoA a *cis*-$\Delta^5$-tetradecenoil--CoA e *trans*-$\Delta^5$-tetradecenoil-CoA, respectivamente?

Há duas formas da enzima acil-CoA-desidrogenase (ver Figura 17-8a): acil-CoA-desidrogenase de cadeia longa (LCAD) e acil-CoA-desidrogenase de cadeia muito longa (VLCAD). Yu e colaboradores mediram os parâmetros cinéticos de ambas as enzimas. Eles usaram os derivados de CoA dos três ácidos graxos: tetradecanoil-CoA ($C_{14}$-CoA), *cis*-$\Delta^5$-tetradecenoil-CoA (c$\Delta^5C_{14}$-CoA), e *trans*-$\Delta^5$-tetradecenoil-CoA (t$\Delta^5C_{14}$-CoA). Os resultados estão mostrados abaixo. (Ver, no Capítulo 6, definições dos parâmetros cinéticos).

| | LCAD | | | VLCAD | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *cis*-$_{14}$-CoA | *cis*-$\Delta^5C_{14}$-CoA | *trans*-$\Delta^5C_{14}$-CoA | *cis*-$_{14}$-CoA | *cis*-$\Delta^5C_{14}$-CoA | *trans*-$\Delta^5C_{14}$-CoA |
| $V_{max}$ | 3,3 | 3,0 | 2,9 | 1,4 | 0,32 | 0,88 |
| $K_m$ | 0,41 | 0,40 | 1,6 | 0,57 | 0,44 | 0,97 |
| $k_{cat}$ | 9,9 | 8,9 | 8,5 | 2,0 | 0,42 | 1,12 |
| $k_{cat}/K_m$ | 24 | 22 | 5 | 4 | 1 | 1 |

(d) Para LCAD, o $K_m$ difere radicalmente para os substratos *cis* e *trans*. Dê uma explicação plausível para essa observação nos termos das estruturas das moléculas dos substratos. (Dica: talvez você queira utilizar a Figura 10-2).

(e) Os parâmetros cinéticos das duas enzimas são relevantes para o processamento diferencial desses ácidos graxos *apenas* se a reação da LCAD ou VLCAD (ou ambas) for a etapa limitante da via. Que evidência existe para apoiar essa suposição?

(f) Como a diferença desses parâmetros cinéticos explica os níveis diferentes dos derivados de CoA encontrados após a incubação da mitocôndria hepática de rato com estearoil-CoA, oeloil-CoA e elaidoil-CoA (mostrados na figura com três painéis)?

Yu e colaboradores mediram a especificidade da tioesterase de mitocôndria de fígado de rato, que hidrolisa acil-CoA em CoA e ácido graxo livre, pelos substratos (ver Capítulo 21). Essa enzima foi aproximadamente duas vezes mais ativa com tioésteres $C_{14}$-CoA do que com tioésteres $C_{18}$-CoA.

(g) Outros pesquisadores sugeriram que os ácidos graxos livres podem passar através das membranas. Em seus experimentos, Yu e colegas verificaram ácido *trans*-$\Delta^5$-tetradecenoico fora da mitocôndria (isto é, no meio) que fora incubada com elaidoil-CoA. Descreva a via que leva a esse ácido *trans*-$\Delta^5$--tetradecenoico extramitocondrial. Não se esqueça de indicar onde na célula as várias transformações ocorrem, assim como as enzimas que catalisam as transformações.

(h) Costuma-se dizer na mídia popular que "gorduras *trans* não são degradadas por suas células e, em vez disso, se acumulam no seu corpo". Em qual sentido essa afirmativa é correta e em qual sentido ela é uma grande simplificação?

## Referência

**Yu, W., Liang, X., Ensenauer, R., Vockley, J., Sweetman, L., & Schultz, H.** (2004) Leaky $\beta$-oxidation of a *trans*-fatty acid. *J. Biol. Chem.* **279**, 52,160–52,167.

# 18

# Oxidação de Aminoácidos e Produção de Ureia



Agora serão abordados os aminoácidos, a última classe de biomoléculas que, por sua degradação oxidativa, contribui significativamente para a produção de energia metabólica. A fração de energia metabólica obtida a partir de aminoácidos, sejam eles provenientes de proteínas da dieta ou de proteínas teciduais, varia muito de acordo com o tipo de organismo e com as condições metabólicas. Carnívoros obtêm (imediatamente após uma refeição) até 90% de suas necessidades energéticas da oxidação de aminoácidos, enquanto herbívoros obtêm apenas uma pequena fração de suas necessidades energéticas a partir dessa via. A maior parte dos microrganismos obtém aminoácidos a partir do ambiente e os utiliza como combustível quando suas condições metabólicas assim o determinarem. Plantas, no entanto, nunca ou quase nunca oxidam aminoácidos para produzir energia; em geral, os carboidratos produzidos a partir de $CO_2$ e $H_2O$ na fotossíntese são sua única fonte de energia. As concentrações de aminoácidos nos tecidos vegetais são cuidadosamente reguladas para satisfazer as necessidades de biossíntese de proteínas, ácidos nucleicos e outras moléculas necessárias para o crescimento. O catabolismo dos aminoácidos não ocorre nas plantas, mas seu propósito é a produção de metabólitos para outras vias biossintéticas.

Nos animais, os aminoácidos sofrem degradação oxidativa em três circunstâncias metabólicas diferentes:

1. Durante a síntese e a degradação normais de proteínas celulares (renovação proteica; Capítulo 27), alguns aminoácidos liberados pela hidrólise de proteínas não são necessários para a biossíntese de novas proteínas, sofrendo degradação oxidativa.
2. Quando uma dieta é rica em proteínas e os aminoácidos ingeridos excedem as necessidades do organismo para a síntese proteica, o excesso é catabolizado; aminoácidos não podem ser armazenados.
3. Durante o jejum ou no diabetes melito não controlado, quando os carboidratos estão indisponíveis ou são utilizados de modo inadequado, as proteínas celulares são utilizadas como combustível.

Em todas essas condições metabólicas, os aminoácidos perdem seu grupo amino para formar $\alpha$-cetoácidos, os "esqueletos de carbono" dos aminoácidos. Os $\alpha$-cetoácidos sofrem oxidação a $CO_2$ e $H_2O$ ou, geralmente mais importante, fornecem unidades de três e quatro carbonos que podem ser convertidas, pela gliconeogênese, em glicose, o combustível para o cérebro, para o músculo esquelético e para outros tecidos.

As vias do catabolismo dos aminoácidos são bastante semelhantes na maioria dos organismos. O foco deste capítulo concentra-se nas vias em vertebrados, pois essas vias têm recebido maior atenção por parte dos pesquisadores. Assim como no catabolismo dos carboidratos e dos ácidos graxos, os processos de degradação de aminoácidos convergem para vias catabólicas centrais, com os esqueletos de carbono da maioria dos aminoácidos encontrando uma via para o ciclo do ácido cítrico. Em alguns casos, as reações das vias de degradação dos aminoácidos representam etapas paralelas ao catabolismo dos ácidos graxos (ver Figura 17-9).

Uma característica importante distingue a degradação dos aminoácidos de outros processos catabólicos descritos até aqui: todos os aminoácidos contêm um grupo amino, e as vias para a degradação dos aminoácidos incluem, portanto, uma etapa fundamental, na qual o grupo $\alpha$-amino é separado do esqueleto de carbono e desviado para as vias do metabolismo do grupo amino (**Figura 18-1**). Serão discutidos inicialmente o metabolismo do grupo amino e a excreção do nitrogênio e, a seguir, o destino dos esqueletos de carbono derivados dos aminoácidos; ao longo deste estudo, será examinado de que modo essas vias estão interconectadas.

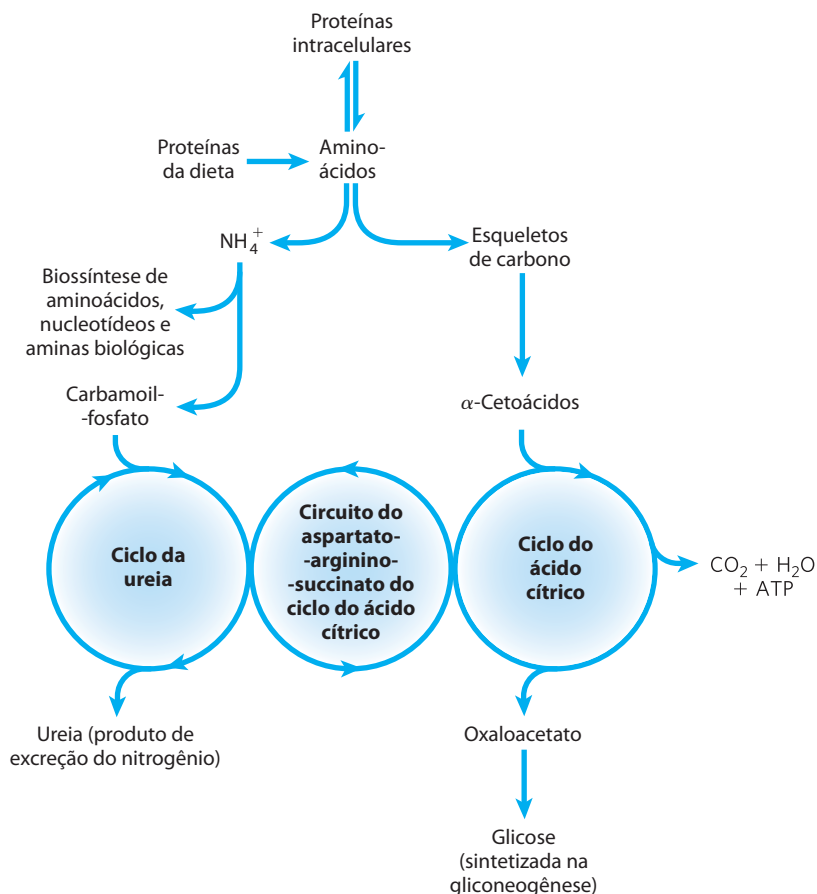



**FIGURA 18-1 Visão geral do catabolismo dos aminoácidos nos mamíferos.** Os grupos amino e os esqueletos de carbono tomam vias separadas, porém interconectadas.

## 18.1 Destinos metabólicos dos grupos amino

O nitrogênio, $N_2$, é abundante na atmosfera, mas é inerte para a utilização na maioria dos processos bioquímicos. Pelo fato de que apenas poucos organismos conseguem converter o $N_2$ em formas biologicamente úteis, como $NH_3$ (Capítulo 22), os grupos amino são cuidadosamente gerenciados nos sistemas biológicos.

A **Figura 18-2a** fornece uma visão geral das vias catabólicas da amônia e dos grupos amino nos vertebrados. Os aminoácidos derivados das proteínas da dieta são a origem da maioria dos grupos amino. A maior parte dos aminoácidos é metabolizada no fígado. Parte da amônia gerada nesse processo é reciclada e utilizada em uma variedade de vias biossintéticas; o excesso é excretado diretamente ou convertido em ureia ou ácido úrico para excreção, dependendo do organismo (Figura 18-2b). O excesso de amônia produzido em outros tecidos (extra-hepáticos) é enviado ao fígado (na forma de grupos amino, como descrito a seguir) para conversão em sua forma de excreção.

Quatro aminoácidos desempenham papéis centrais no metabolismo do nitrogênio: glutamato, glutamina, alanina e aspartato. O lugar especial desses quatro aminoácidos no metabolismo do nitrogênio não é um acidente evolutivo. Esses aminoácidos em especial são aqueles mais facilmente convertidos em intermediários do ciclo do ácido cítrico: glutamato e glutamina são convertidos em α-cetoglutarato, alanina em piruvato e aspartato em oxaloacetato. Glutamato e glutamina são especialmente importantes, atuando como uma espécie de ponto de encontro para os grupos amino. No citosol das células do fígado (hepatócitos), os grupos amino da maior parte dos aminoácidos são transferidos para o α-cetoglutarato, formando glutamato, que entra na mitocôndria e perde seu grupo amino para formar $NH_4^+$. O excesso de amônia produzido na maior parte dos demais tecidos é convertido no nitrogênio amídico da glutamina, que circula até chegar ao fígado, entrando na mitocôndria hepática. Glutamina, glutamato ou ambos estão presentes na maior parte dos tecidos em concentrações mais elevadas que os demais aminoácidos.

No músculo esquelético, os grupos amino que excedem as necessidades geralmente são transferidos ao piruvato para formar alanina, outra molécula importante para o transporte de grupos amino até o fígado. Será mostrado na Seção 18.2 que o aspartato participa dos processos metabólicos que ocorrem tão logo os grupos amino sejam entregues no fígado.

A presente discussão começa com a degradação das proteínas da dieta e depois faz uma descrição geral dos destinos metabólicos dos grupos amino.

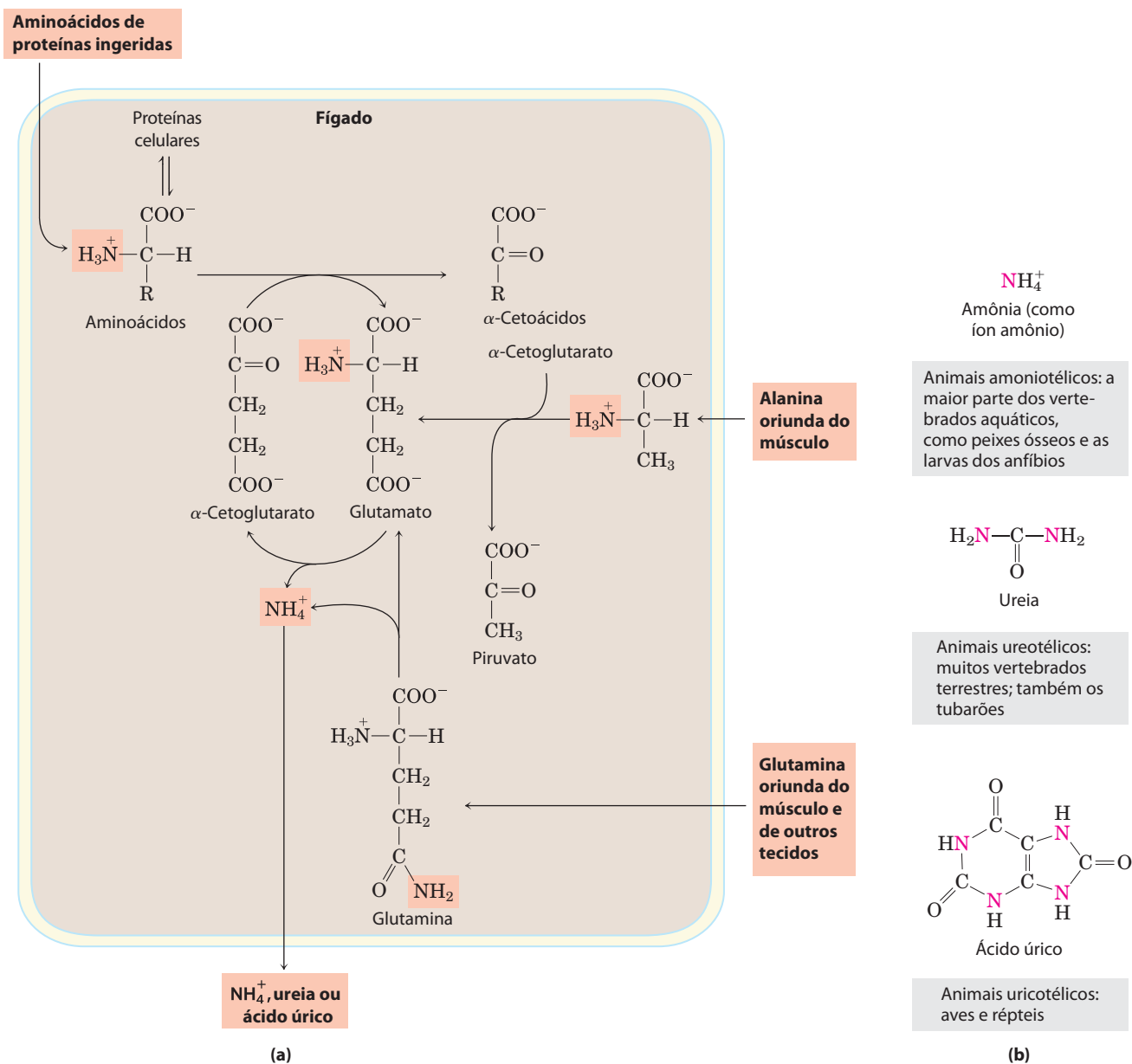



**FIGURA 18-2 Catabolismo dos grupos amino. (a)** Visão geral do catabolismo dos grupos amino (sombreados) no fígado de vertebrados. **(b)** Formas de excreção do nitrogênio. O excesso de $NH_4^+$ é excretado como amônia (micróbios, peixes ósseos), ureia (maior parte dos vertebrados terrestres) ou ácido úrico (aves e répteis terrestres). Observe que os átomos de carbono da ureia e do ácido úrico estão altamente oxidados; o organismo descarta carbonos apenas após extrair a maior parte da energia de oxidação disponível.

## As proteínas da dieta são enzimaticamente degradadas até aminoácidos

Em humanos, a degradação das proteínas ingeridas até seus aminoácidos constituintes acontece no trato gastrintestinal. A chegada de proteínas da dieta ao estômago estimula a mucosa gástrica a secretar o hormônio **gastrina**, que, por sua vez, estimula a secreção de ácido clorídrico pelas células parietais e de pepsinogênio pelas células principais das glândulas gástricas (**Figura 18-3a**). A acidez do suco gástrico (pH 1,0 a 2,5) lhe permite funcionar tanto como antisséptico, matando a maior parte das bactérias e de outras células estranhas ao organismo, quanto como agente desnaturante, desenovelando proteínas globulares e tornando suas ligações peptídicas internas mais suscetíveis à hidrólise enzimática. O **pepsinogênio** ($M_r$ 40.554), precursor inativo ou zimogênio (p. 231), é convertido na pepsina ativa ($M_r$ 34.614) por meio de uma clivagem autocatalisada (clivagem mediada pelo próprio pepsinogênio) que ocorre apenas em pH baixo. No estômago, a pepsina hidrolisa as proteínas ingeridas, atuando em ligações peptídicas em que o resíduo de aminoácido localizado na porção aminoterminal provém dos aminoácidos aromáticos Phe, Trp e Tyr (ver Tabela 3-6), clivando cadeias polipeptídicas longas em uma mistura de peptídeos menores.

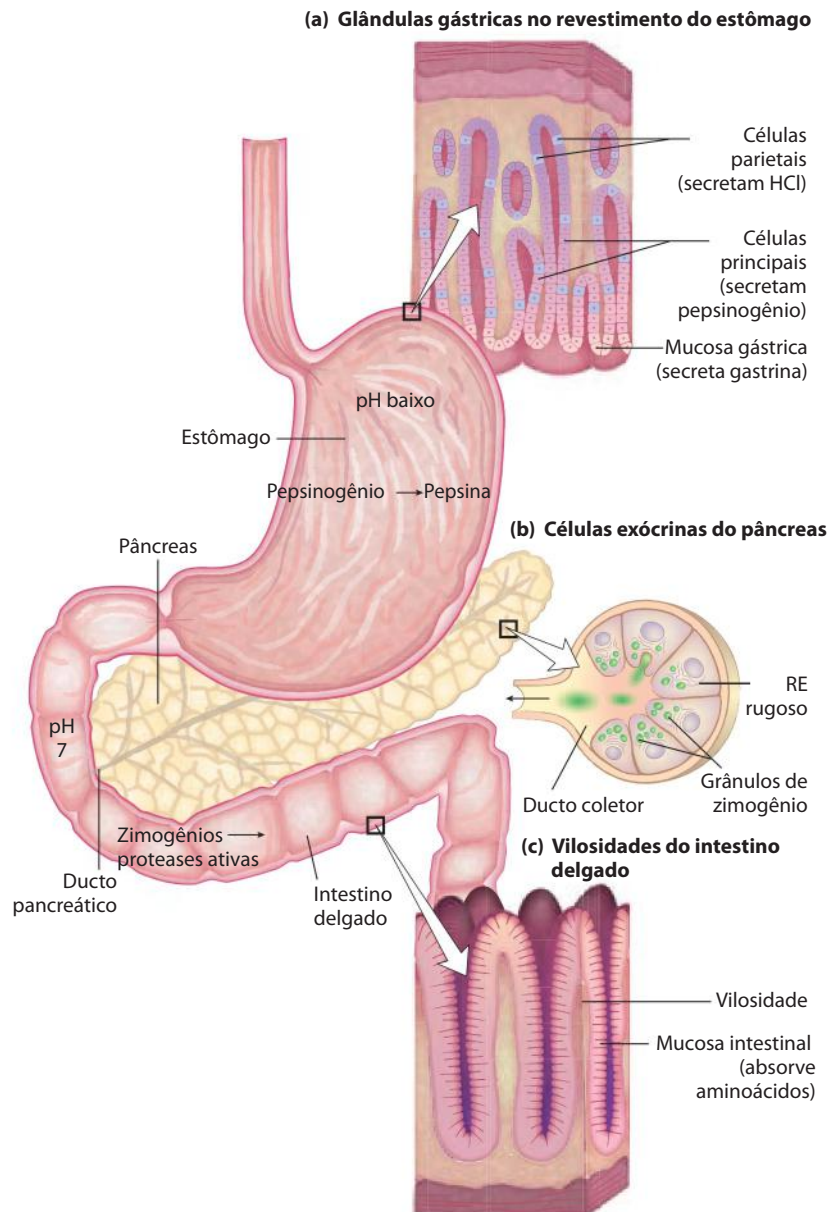



**FIGURA 18-3 Parte do trato digestório (gastrintestinal) humano. (a)** As células parietais e as células principais das glândulas gástricas secretam seus produtos em resposta ao hormônio gastrina. A pepsina inicia o processo de degradação das proteínas no estômago. **(b)** O citoplasma das células exócrinas é completamente preenchido pelo retículo endoplasmático rugoso, o sítio de síntese dos zimogênios e de muitas enzimas digestivas. Os zimogênios são concentrados em partículas de transporte circundadas por membranas, denominadas grânulos de zimogênios. Quando uma célula exócrina é estimulada, sua membrana plasmática funde-se com a membrana do grânulo de zimogênio e estes são liberados por exocitose no lúmen do ducto coletor. Os ductos coletores, por fim, levam ao ducto pancreático e daí ao intestino delgado. **(c)** Os aminoácidos são absorvidos pela camada de células epiteliais (mucosa intestinal) das vilosidades e chegam aos capilares. Lembre que os produtos da hidrólise dos lipídeos no intestino delgado, após sua absorção pela mucosa intestinal, entram no sistema linfático (ver Figura 17-1).

À medida que o conteúdo ácido do estômago passa para o intestino delgado, o pH baixo desencadeia a secreção do hormônio **secretina** na corrente sanguínea. A secretina estimula o pâncreas a secretar bicarbonato no intestino delgado, para neutralizar o HCl gástrico, aumentando abruptamente o pH, que fica próximo a 7. (Todas as secreções pancreáticas chegam ao intestino delgado pelo ducto pancreático.) A digestão das proteínas prossegue agora no intestino delgado. A chegada de aminoácidos na parte superior do intestino delgado (duodeno) determina a liberação para o sangue do hormônio **colecistocinina**, que estimula a secreção de diversas enzimas pancreáticas com atividades ótimas em pH 7 a 8. O **tripsinogênio**, o **quimotripsinogênio** e as **procarboxipeptidases A** e **B** – os zimogênios da **tripsina**, da **quimotripsina** e das **carboxipeptidases A** e **B** – são sintetizados e secretados pelas células exócrinas do

pâncreas (Figura 18-3b). O tripsinogênio é convertido em sua forma ativa, a tripsina, pela **enteropeptidase**, uma enzima proteolítica secretada pelas células intestinais. A tripsina livre catalisa então a conversão de moléculas adicionais de tripsinogênio em tripsina (ver Figura 6-38). A tripsina também ativa o quimotripsinogênio, as procarboxipeptidases e a proelastase.

Qual a razão para esse mecanismo elaborado ativar enzimas digestivas dentro do trato gastrintestinal? A síntese dessas enzimas como precursores inativos protege as células exócrinas do ataque proteolítico destrutivo. O pâncreas se protege ainda mais da autodigestão por meio da síntese de um inibidor específico, a proteína denominada **inibidor pancreático da tripsina** (p. 232), que previne efetivamente a produção prematura de enzimas proteolíticas ativas dentro das células pancreáticas.

A tripsina e a quimotripsina continuam a hidrólise dos peptídeos produzidos pela pepsina no estômago. Esse estágio da digestão proteica é realizado com grande eficiência, pois a pepsina, a tripsina e a quimotripsina apresentam especificidades distintas quanto aos aminoácidos sobre os quais atuam (ver Tabela 3-6). A degradação de pequenos peptídeos no intestino delgado é então completada por outras peptidases intestinais. Estas incluem as carboxipeptidases A e B (duas enzimas que contêm zinco), as quais removem resíduos sucessivos da extremidade carboxiterminal dos peptídeos e uma **aminopeptidase**, que hidrolisa resíduos sucessivos da extremidade aminoterminal de peptídeos pequenos. A mistura resultante de aminoácidos livres é transportada para dentro das células epiteliais que revestem o intestino delgado (Figura 18-3c), através dos quais os aminoácidos entram nos capilares sanguíneos nas vilosidades e são transportados até o fígado. Nos humanos, a maior parte das proteínas globulares obtidas a partir de animais é hidrolisada quase completamente até aminoácidos no trato gastrintestinal, mas algumas proteínas fibrosas, como a queratina, são digeridas apenas parcialmente. Além disso, o conteúdo proteico de alguns alimentos obtidos a partir de vegetais está protegido contra a degradação por envoltórios não digeríveis de celulose.

A **pancreatite aguda** é uma doença causada por obstrução da via normal pela qual as secreções pancreáticas chegam ao intestino. Os zimogênios das enzimas proteolíticas são prematuramente convertidos em suas formas cataliticamente ativas *dentro* das células pancreáticas e atacam o próprio tecido pancreático. Isso causa dores intensas e lesão ao órgão, o que pode ser fatal. ■

## O piridoxal-fosfato participa da transferência de grupos α-amino para o α-cetoglutarato

Chegando ao fígado, a primeira etapa no catabolismo da maioria dos L-aminoácidos é a remoção de seus grupos α-amino, realizada por enzimas denominadas **aminotransferases** ou **transaminases**. Nessas reações de **transaminação**, o grupo α-amino é transferido para o carbono α do α-cetoglutarato, liberando o correspondente α-cetoácido, análogo do aminoácido (**Figura 18-4**). Não ocorre desaminação (perda de grupos amino) efetiva nessas reações, pois o α-cetoglutarato torna-se aminado enquanto o α-aminoácido é desaminado. O efeito das reações de transaminação é coletar grupos amino de diferentes aminoácidos, na forma de L-glutamato. O glutamato então funciona como doador de grupos amino para vias biossintéticas ou para vias de excreção, que levam à eliminação de produtos de excreção nitrogenados.

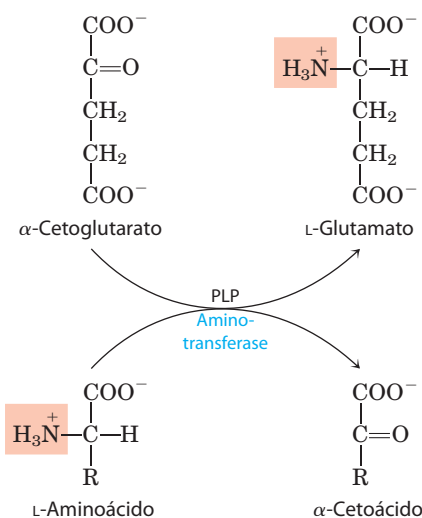



**FIGURA 18-4 Transaminações catalisadas por enzimas.** Em muitas reações de aminotransferases, o α-cetoglutarato é o aceptor do grupo amino. Todas as aminotransferases necessitam de piridoxal-fosfato (PLP) como cofator. Embora a reação esteja mostrada aqui no sentido da transferência do grupo amino para o α-cetoglutarato, ela é facilmente reversível.

As células contêm tipos diferentes de aminotransferases. Muitas são específicas para o α-cetoglutarato como aceptor do grupo amino, mas diferem em sua especificidade para o L-aminoácido. Essas enzimas são denominadas em função do doador do grupo amino (p. ex., alanina-aminotransferase, aspartato-aminotransferase). As reações catalisadas pelas aminotransferases são livremente reversíveis, tendo uma constante de equilíbrio de cerca de 1,0 ($\Delta G'^\circ \approx 0$ kJ/mol).

Todas as aminotransferases apresentam o mesmo grupo prostético e o mesmo mecanismo de reação. O grupo prostético é o **piridoxal-fosfato** (**PLP**), a forma de coenzima da piridoxina ou vitamina $B_6$. O piridoxal-fosfato já foi citado no Capítulo 15, como coenzima na reação da glicogênio-fosforilase, mas seu papel naquela reação não é representativo de sua função usual como coenzima. Seu principal papel nas células é o metabolismo de moléculas com grupos amino.

O piridoxal-fosfato funciona como carreador intermediário de grupos amino, no sítio ativo das aminotransferases. Ele sofre transformações reversíveis entre sua forma aldeídica, o piridoxal-fosfato, que pode aceitar um grupo amino, e sua forma aminada, a piridoxamina-fosfato, que pode doar seu grupo amino para um α-cetoácido (**Figura 18-5a**). Geralmente, o piridoxal-fosfato encontra-se ligado covalentemente ao sítio ativo da enzima por meio de uma ligação aldimina (base de Schiff) com o grupo ε-amino de um resíduo de Lys (Figura 18-5b, d).

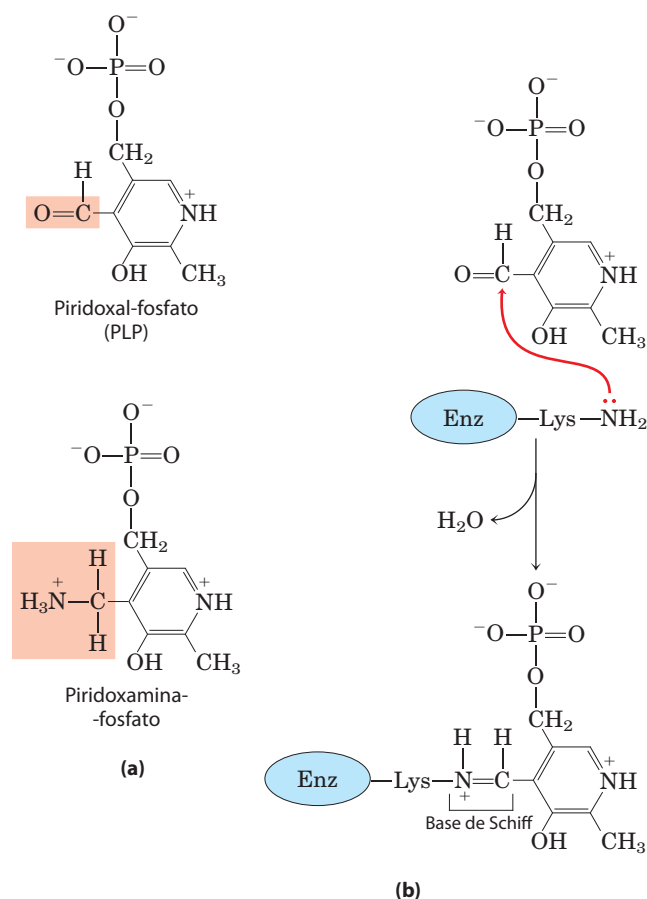



**FIGURA 18-5 Piridoxal-fosfato, o grupo prostético das aminotransferases.** **(a)** Piridoxal-fosfato (PLP) e sua forma aminada, piridoxamina-fosfato, são coenzimas fortemente ligadas às aminotransferases. Os grupos funcionais estão sombreados. **(b)** O piridoxal-fosfato está ligado à enzima por meio de interações não covalentes e pela formação de uma base de Schiff (aldimina) com um resíduo de Lys no sítio ativo. Os passos para a formação da base de Schiff a partir de uma amina primária e de um grupo carbonila estão detalhados na Figura 14-6. **(c)** PLP (em vermelho) ligado a um dos dois sítios ativos da enzima dimérica aspartato-aminotransferase, uma aminotransferase típica. **(d)** Visão do sítio ativo, com o PLP (em vermelho, com o fósforo em amarelo) em uma ligação aldimina com a cadeia lateral da $Lys^{258}$ (em roxo). **(e)** Outra visão do sítio ativo, com o PLP ligado a um análogo do substrato, o 2-metilaspartato (em verde) por meio de uma base de Schiff (PDB ID 1AJS).

O piridoxal-fosfato participa de uma variedade de reações nos carbonos $\alpha$, $\beta$ e $\gamma$ (C-2 a C-4) de aminoácidos. Reações no carbono $\alpha$ (**Figura 18-6**) incluem racemizações (interconvertendo L- e D-aminoácidos) e descarboxilações, assim como transaminações. O piridoxal-fosfato desempenha o mesmo papel químico em cada uma dessas reações. Uma ligação com o carbono $\alpha$ do substrato é rompida, removendo um próton ou um grupo carboxila. O par de elétrons que permanece no carbono $\alpha$ produziria um carbânion altamente instável, mas o piridoxal-fosfato fornece estabilização desse intermediário por ressonância (Figura 18-6, no detalhe). A estrutura altamente conjugada do PLP (escoadouro de elétrons) permite o deslocamento da carga negativa.

As aminotransferases (Figura 18-5) são exemplos clássicos de enzimas que catalisam reações bimoleculares de pingue-pongue (ver Figura 6-13b), nas quais o primeiro substrato reage e o produto deve deixar o sítio ativo antes que o segundo substrato possa se ligar. Assim, o aminoácido liga-se ao sítio ativo, doa seu grupo amino ao piridoxal-fosfato e deixa o sítio ativo na forma de um $\alpha$-cetoácido. O outro $\alpha$-cetoácido, que funciona como substrato, se liga então ao sítio ativo, aceita o grupo amino da piridoxamina-fosfato e deixa o sítio ativo na forma de um aminoácido.

## O glutamato libera seu grupo amino na forma de amônia no fígado

Como foi visto, os grupos amino de muitos $\alpha$-aminoácidos são coletados, no fígado, na forma do grupo amino de moléculas de L-glutamato. Esses grupos amino devem ser removidos do glutamato e preparados para excreção. Nos hepatócitos, o glutamato é transportado do citosol para a mitocôndria, onde sofre **desaminação oxidativa**, catalisada pela **L-glutamato-desidrogenase** ($M_r$ 330.000). Nos

**MECANISMO–FIGURA 18-6 Algumas transformações no carbono α de aminoácidos, facilitadas pelo piridoxal-fosfato.** O piridoxal-fosfato geralmente está ligado à enzima por meio de uma base de Schiff, também denominada aldimina interna. Essa forma ativada do PLP facilmente sofre transaminação, para formar uma nova base de Schiff (aldimina externa) com o grupo α-amino do aminoácido que funciona como substrato (ver Figura 18-5b, d). Três destinos alternativos para a aldimina externa são mostrados: **A** transaminação, **B** racemização e **C** descarboxilação. A base de Schiff entre o PLP e o aminoácido está conjugada com o anel de piridina, um escoadouro de elétrons que permite o deslocamento de um par de elétrons, para evitar a formação de um carbânion instável no carbono α (no detalhe). Um intermediário quinonoide está envolvido nos três tipos de reação. A via **A** de transaminação é especialmente importante para as vias descritas neste capítulo. A via ressaltada em amarelo (mostrada da esquerda para a direita) representa apenas parte da reação global catalisada por aminotransferases. Para completar o processo, um segundo α-cetoácido substitui aquele que é liberado e é convertido em um aminoácido pela reversão desses passos reacionais (da direita para a esquerda). O piridoxal-fosfato também está envolvido em certas reações envolvendo os carbonos β e γ de alguns aminoácidos (não mostrado). **Mecanismos de reação para o piridoxal-fosfato**

mamíferos, essa enzima está presente na matriz mitocondrial. É a única enzima que utiliza $NAD^+$ ou $NADP^+$ como aceptor de equivalentes redutores (**Figura 18-7**).

A ação combinada de uma aminotransferase e da glutamato-desidrogenase é conhecida como **transdesaminação**. Uns poucos aminoácidos contornam a via de transdesaminação e sofrem diretamente desaminação oxidativa. O destino do $NH_4^+$ produzido por qualquer desses processos de desaminação é discutido em detalhe na Seção 18.2. O α-cetoglutarato formado a partir da desaminação do glutamato pode ser utilizado no ciclo do ácido cítrico e para a síntese de glicose.

A glutamato-desidrogenase opera em uma importante intersecção do metabolismo do carbono e do nitrogênio. Essa enzima alostérica com seis subunidades idênticas tem sua atividade influenciada por um arranjo complicado de moduladores alostéricos. Os mais bem estudados são o modulador positivo ADP e o modulador negativo GTP. A ra-

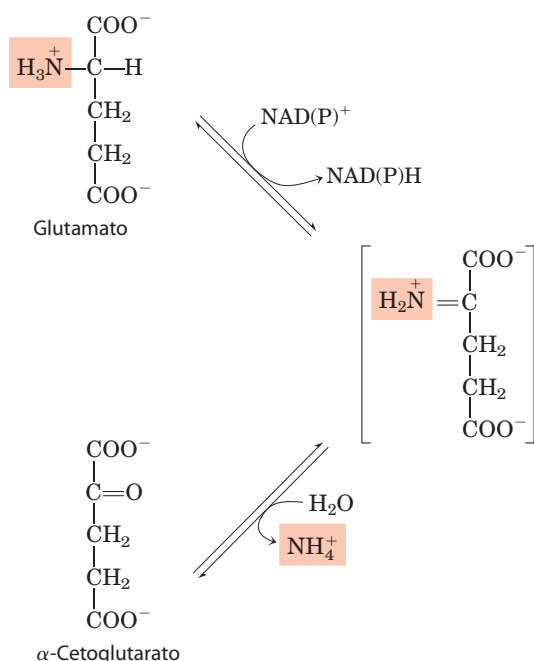



**FIGURA 18-7 Reação catalisada pela glutamato-desidrogenase.** A glutamato-desidrogenase do fígado de mamíferos tem a capacidade incomum de utilizar tanto $NAD^+$ quanto $NADP^+$ como cofator. As glutamato-desidrogenases de plantas e microrganismos normalmente são específicas para um ou outro desses aceptores de elétrons. A enzima dos mamíferos é regulada alostericamente por GTP e ADP.

zão metabólica para esse padrão de regulação ainda não foi esclarecida em detalhe. Mutações que alterem o sítio alostérico para a ligação do GTP ou que causem ativação permanente da glutamato-desidrogenase levam a uma doença genética humana, denominada síndrome do hiperinsulinismo com hiperamonemia, caracterizada por níveis elevados de amônia na corrente sanguínea e hipoglicemia.

## A glutamina transporta a amônia na corrente sanguínea

A amônia é bastante tóxica para os tecidos animais (posteriormente serão examinadas algumas possíveis razões para essa toxicidade) e seus níveis no sangue são regulados. Em muitos tecidos, incluindo o cérebro, alguns processos, como a degradação de nucleotídeos, geram amônia livre. Na maioria dos animais, a maior parte dessa amônia livre é convertida em um composto não tóxico antes de ser exportada dos tecidos extra-hepáticos para o sangue e transportada até o fígado ou até os rins. Para essa função de transporte, o glutamato, essencial para o metabolismo *intracelular* do grupo amino, é substituído pela L-glutamina. A amônia livre produzida nos tecidos combina-se com o glutamato, produzindo glutamina, pela ação da **glutamina-sintetase**. Essa reação requer ATP e ocorre em duas etapas (**Figura 18-8**). Inicialmente, o glutamato e o ATP reagem para formar ADP e um intermediário $\gamma$-glutamil-fosfato, que então reage com a amônia, produzindo glutamina e fosfato inorgânico.

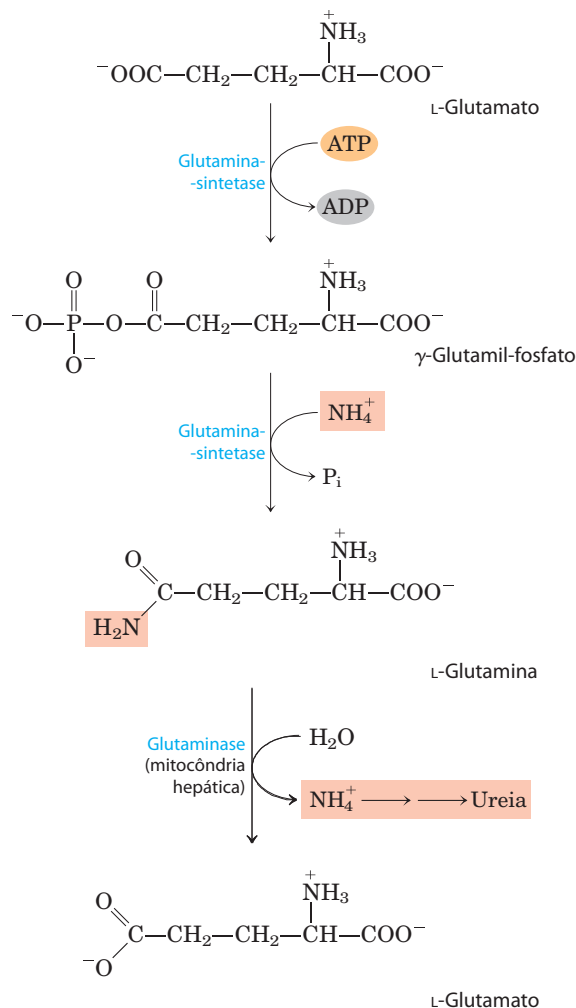



**FIGURA 18-8 Transporte de amônia na forma de glutamina.** O excesso de amônia nos tecidos é adicionado ao glutamato para formar glutamina, processo catalisado pela glutamina-sintetase. Após ser transportada pela corrente sanguínea, a glutamina entra no fígado e $NH_4^+$ é liberado na mitocôndria pela enzima glutaminase.

A glutamina é uma forma de transporte não tóxico para a amônia; ela normalmente está presente no sangue em concentrações muito maiores que os demais aminoácidos. A glutamina também serve como fonte de grupos amino em várias reações biossintéticas. A glutamina-sintetase é encontrada em todos os organismos, sempre desempenhando um papel metabólico central. Nos microrganismos, essa enzima serve como via de entrada essencial do nitrogênio fixado em sistemas biológicos. (Os papéis da glutamina e da glutamina-sintetase no metabolismo são discutidos no Capítulo 22.)

Na maioria dos animais terrestres, a glutamina que excede as necessidades de biossíntese é transportada pelo sangue para o intestino, o fígado e os rins, para ser processada. Nesses tecidos, o nitrogênio amídico é liberado como íon amônio na mitocôndria, onde a enzima **glutaminase** converte glutamina em glutamato e $NH_4^+$ (Figura 18-8). O

$NH_4^+$ do intestino e dos rins é transportado no sangue para o fígado. No fígado, a amônia de todas essas fontes é utilizada na síntese da ureia. Parte do glutamato produzido na reação da glutaminase pode ser adicionalmente processada no fígado pela glutamato-desidrogenase, liberando mais amônia e produzindo esqueletos de carbono para utilização como combustível. Contudo, a maior parte do glutamato entra em reações de transaminação necessárias para a biossíntese de aminoácidos e para outros processos (Capítulo 22).

Na acidose metabólica (p. 688), há um aumento do processamento da glutamina pelos rins. Nem todo o excesso de $NH_4^+$ assim produzido é liberado para a corrente sanguínea ou convertido em ureia; parte é excretado diretamente na urina. No rim, o $NH_4^+$ forma sais com ácidos metabólicos, facilitando sua remoção na urina. O bicarbonato produzido pela descarboxilação do $\alpha$-cetoglutarato no ciclo do ácido cítrico também pode funcionar como tampão no plasma sanguíneo. Tomados em conjunto, esses efeitos do metabolismo da glutamina no rim tendem a contrabalançar a acidose. ■

## A alanina transporta a amônia dos músculos esqueléticos para o fígado

A alanina também desempenha um papel especial no transporte dos grupos amino para o fígado em uma forma não tóxica, por meio de uma via denominada **ciclo da glicose-alanina** (**Figura 18-9**). No músculo e em alguns outros tecidos que degradam aminoácidos como combustível, os grupos amino são coletados na forma de glutamato, por transaminação (Figura 18-2a). O glutamato pode ser convertido em glutamina para transporte ao fígado, como descrito anteriormente, ou pode transferir seu grupo $\alpha$-amino para o piruvato, produto da glicólise muscular facilmente disponível, pela ação da **alanina-aminotransferase** (Figura 18-9). A alanina assim produzida passa para o sangue e segue para o fígado. No citosol dos hepatócitos, a alanina-aminotransferase transfere o grupo amino da alanina para o $\alpha$-cetoglutarato, formando piruvato e glutamato. O glutamato então entra na mitocôndria, onde a reação da glutamato-desidrogenase libera $NH_4^+$ (Figura 18-7), ou sofre transaminação com o oxaloacetato para formar aspartato, outro doador de nitrogênio para a síntese de ureia.

A utilização de alanina para o transporte da amônia dos músculos esqueléticos para o fígado é outro exemplo da economia intrínseca dos organismos vivos. Os músculos esqueléticos em contração vigorosa operam anaerobiamente, produzindo piruvato e lactato pela glicólise, assim como amônia pela degradação proteica. De algum modo, esses produtos devem chegar ao fígado, onde o piruvato e o lactato são incorporados na glicose, que volta aos músculos, e a amônia é convertida em ureia para excreção. O ciclo da glicose-alanina, em conjunto com o ciclo de Cori (ver Quadro 14-2 e Figura 23-19), realiza essa operação. O custo energético da gliconeogênese é assim imposto ao fígado e não ao músculo, e todo o ATP disponível no músculo é destinado à contração muscular.

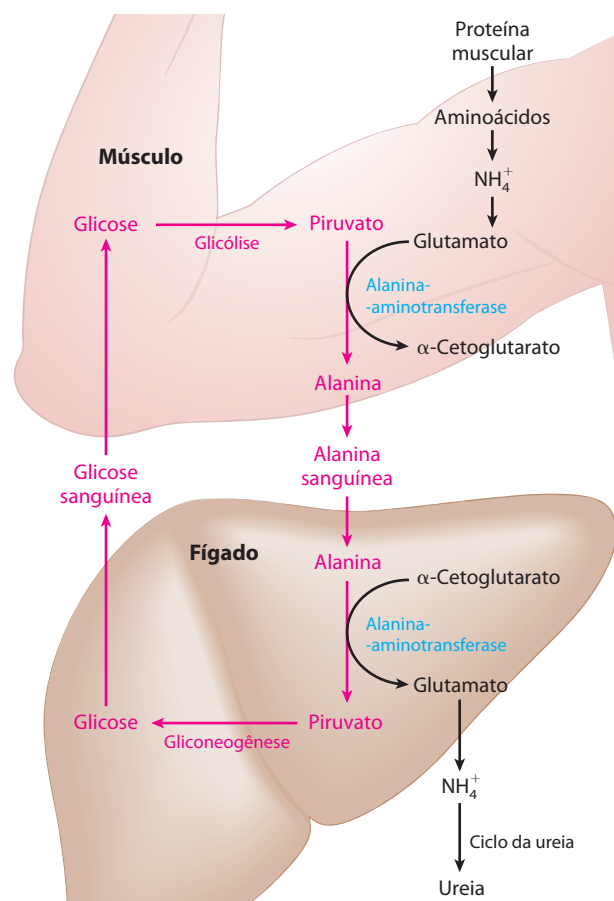



**FIGURA 18-9 O ciclo da glicose-alanina.** A alanina funciona como transportadora de amônia e do esqueleto de carbono do piruvato do músculo esquelético até o fígado. A amônia é excretada, e o piruvato é utilizado para produzir glicose, que é devolvida ao músculo.

## A amônia é tóxica para os animais

A produção catabólica de amônia impõe um sério problema bioquímico, por ser muito tóxica. A base molecular para essa toxicidade não é completamente compreendida. Os estágios finais da intoxicação por amônia em humanos são caracterizados por indução de um estado de coma, acompanhado por edema cerebral (aumento no conteúdo de água do cérebro) e aumento da pressão intracraniana, de modo que pesquisas e especulações em torno da intoxicação por amônia têm sido focalizadas nesse tecido. As especulações centralizam-se em uma possível depleção do ATP nas células do cérebro.

A amônia facilmente cruza a barreira hematoencefálica, de modo que qualquer condição que aumente os níveis de amônia na circulação sanguínea também exporá o cérebro a altas concentrações. O cérebro em desenvolvimento é mais suscetível aos efeitos deletérios do íon amônio que o cérebro adulto. Os danos causados pela toxicidade do amônio incluem perda de neurônios, alteração na formação de sinapses e deficiência geral no metabolismo energético celular. A remoção do excesso de amônia presente no citosol

requer a aminação redutora do α-cetoglutarato a glutamato pela glutamato-desidrogenase (no sentido inverso da reação descrita anteriormente; Figura 18-7) e a conversão de glutamato em glutamina pela glutamina-sintetase. Ambas as enzimas estão presentes em níveis altos no cérebro, embora a reação da glutamina-sintetase seja quase certamente a via mais importante para a remoção da amônia. Altos níveis de $NH_4^+$ levam a um aumento nos níveis de glutamina, que atua como soluto osmoticamente ativo (osmólito) nos astrócitos do cérebro, os quais são células do sistema nervoso em forma de estrela, que fornecem nutrientes, suporte e isolamento elétrico para os neurônios.* Isso desencadeia um aumento na captação de água, que entra nos astrócitos para manter o equilíbrio osmótico, levando ao edema das células e do cérebro e ao coma.

A depleção de glutamato pela reação da glutamina-sintetase pode ter efeitos adicionais no cérebro. O glutamato e seu derivado γ-aminobutirato (GABA; ver Figura 22-31), são importantes neurotransmissores; a sensibilidade do cérebro à amônia pode refletir uma depleção de neurotransmissores, assim como alterações no balanço osmótico celular. ■

Ao concluir esta discussão a respeito do metabolismo do grupo amino, observe que foram descritos diversos processos que depositam o excesso de amônia na mitocôndria dos hepatócitos (Figura 18-2). Agora será estudado o destino dessa amônia.

### RESUMO 18.1 Destinos metabólicos dos grupos amino

- Humanos obtêm uma pequena fração de sua energia oxidativa a partir do catabolismo dos aminoácidos. Os aminoácidos provêm da degradação normal de proteínas celulares (reciclagem), da degradação de proteínas da dieta e da degradação de proteínas teciduais no lugar de outros combustíveis, durante o jejum ou no diabetes melito não controlado.
- Proteases degradam as proteínas da dieta no estômago e no intestino delgado. A maioria das proteases é primeiramente sintetizada como zimogênios inativos.
- A primeira etapa no catabolismo dos aminoácidos é separar o grupo amino do esqueleto de carbono. Na maior parte dos casos, o grupo amino é transferido para o α-cetoglutarato, formando glutamato. Essa reação de transaminação requer a coenzima piridoxal-fosfato.
- O glutamato é transportado à mitocôndria hepática, onde a glutamato-desidrogenase libera o grupo amino na forma de íon amônio ($NH_4^+$). A amônia produzida em outros tecidos é transportada ao fígado como o nitrogênio amídico da glutamina ou, no transporte a partir do músculo esquelético, como o grupo amino da alanina.
- O piruvato produzido pela desaminação da alanina no fígado é convertido em glicose, a qual é transportada de volta ao músculo como parte do ciclo da glicose-alanina.

* N. de T. Outras células gliais distintas dos astrócitos são responsáveis pelo isolamento elétrico: oligodendrócitos (no sistema nervoso central) e células de Schwann (no sistema nervoso periférico).

## 18.2 Excreção de nitrogênio e ciclo da ureia

Se não forem reutilizados para a síntese de novos aminoácidos ou de outros produtos nitrogenados, os grupos amino são canalizados em um único produto final de excreção (**Figura 18-10**). A maioria das espécies aquáticas, como os peixes ósseos, é **amoniotélica** e excreta o nitrogênio amínico como amônia. A amônia tóxica é simplesmente diluída na água do ambiente. Os animais terrestres necessitam de vias para a excreção do nitrogênio que minimizem a toxicidade e a perda de água. A maior parte dos animais terrestres é **ureotélica** e excreta o nitrogênio amínico na forma de ureia; aves e répteis são **uricotélicos**, excretando o nitrogênio amínico como ácido úrico. (A via de síntese do ácido úrico é descrita na Figura 22-48.) As plantas reciclam praticamente todos os grupos amino, e a excreção de nitrogênio ocorre apenas em circunstâncias muito incomuns.

Nos organismos ureotélicos, a amônia depositada na mitocôndria dos hepatócitos é convertida em ureia no **ciclo da ureia**. Essa via foi descoberta em 1932 por Hans Krebs (que mais tarde também descobriu o ciclo do ácido cítrico) e seu colaborador Kurt Henseleit, estudante de medicina. A produção de ureia ocorre quase exclusivamente no fígado, sendo o destino da maior parte da amônia canalizada para esse órgão. A ureia passa para a circulação sanguínea e chega aos rins, sendo excretada na urina. A produção de ureia é agora o foco desta discussão.

### A ureia é produzida a partir da amônia por meio de cinco etapas enzimáticas

O ciclo da ureia inicia dentro da mitocôndria hepática, mas três de suas etapas seguintes ocorrem no citosol; o ciclo assim abrange dois compartimentos celulares (Figura 18-10). O primeiro grupo amino que entra no ciclo da ureia é derivado da amônia na matriz mitocondrial – a maior parte desse $NH_4^+$ é fornecida pelas vias descritas anteriormente. O fígado também recebe parte da amônia pela veia porta, sendo essa amônia produzida no intestino pela oxidação bacteriana de aminoácidos. Qualquer que seja sua fonte, o $NH_4^+$ presente na mitocôndria hepática é utilizado imediatamente, juntamente com o $CO_2$ (como $HCO_3^-$) produzido pela respiração mitocondrial, para formar carbamoil-fosfato na matriz (**Figura 18-11a**; ver também Figura 18-10). Essa reação é dependente de ATP, sendo catalisada pela **carbamoil-fosfato-sintetase I**, enzima regulatória (ver a seguir). A forma mitocondrial da enzima é diferente da forma

**FIGURA 18-10 O ciclo da ureia e as reações que fornecem grupos amino para o ciclo.** As enzimas que catalisam essas reações (cujos nomes aparecem no texto) estão distribuídas entre a matriz mitocondrial e o citosol. Um grupo amino entra no ciclo da ureia como carbamoil-fosfato, formado na matriz; o outro entra como aspartato, produzido na matriz pela transaminação entre oxaloacetato e glutamato, catalisada pela aspartato-aminotransferase. O ciclo da ureia consiste em quatro passos. ❶ Formação de citrulina a partir de ornitina e carbamoil-fosfato (entrada do primeiro grupo amino); a citrulina passa para o citosol. ❷ Produção de arginino-succinato, via um intermediário citrulil-AMP (entrada do segundo grupo amino). ❸ Formação da arginina a partir do arginino-succinato; essa reação libera fumarato, que entra no ciclo do ácido cítrico. ❹ Formação de ureia; esta reação também regenera a ornitina. As vias pelas quais o $NH_4^+$ chega à matriz mitocondrial dos hepatócitos foram discutidas na Seção 18.1.

Aminoácidos
Alanina (do músculo)
α-Cetoglutarato
α-Cetoácido
Glutamina (dos tecidos extra-hepáticos)
Glutamato
Glutamina
glutaminase
Glutamato
Oxaloacetato
Glutamato-desidrogenase
Aspartato-aminotransferase
α-Ceto-glutarato
Aspartato
$NH_4^+$
$HCO_3$
2 ATP
$2ADP + P_i$
Carbamoil-
-fosfato-
-sintetase i
Carbamoil-fosfato
$P_i$
Matriz mitocondrial
Ornitina
Citrulina
Citosol
Citrulina
ATP
$PP_i$
Intermediário citrulil-AMP
Ciclo da ureia
Ornitina
Ureia
$H_2O$
Aspartato
AMP
Arginina
Fumarato
Arginino-succinato

citosólica (II), a qual tem uma função distinta na biossíntese das pirimidinas (Capítulo 22).

O carbamoil-fosfato, que funciona como doador ativado de grupos carbamoila, entra no ciclo da ureia. O ciclo tem apenas quatro etapas enzimáticas. Primeiro, o carbamoil-fosfato doa seu grupo carbamoila para a ornitina, formando citrulina, com a liberação de $P_i$ (Figura 18-10, etapa ❶). A reação é catalisada pela **ornitina-transcarbamoilase.** A ornitina não é um dos 20 aminoácidos encontrados nas proteínas, mas é um intermediário-chave no metabolismo do nitrogênio. Ela é sintetizada a partir do glutamato, em uma via com cinco etapas, descrita no Capítulo 22. A ornitina desempenha um papel que se assemelha àquele do oxaloacetato no ciclo do ácido cítrico, aceitando material a cada volta do ciclo da ureia. A citrulina produzida no primeiro passo do ciclo da ureia passa da mitocôndria para o citosol.

Os próximos dois passos trazem o segundo grupo amino. A fonte é o aspartato produzido na mitocôndria por transaminação e transportado para o citosol. A reação de condensação entre o grupo amino do aspartato e o grupo ureido (carbonila) da citrulina forma arginino-succinato (etapa ❷ na Figura 18-10). Essa reação citosólica, catalisada pela **arginino-succinato-sintetase**, requer ATP e ocorre via um intermediário citrulil-AMP (Figura 18-11b). O arginino-succinato é então clivado pela **arginino-succinase** (etapa ❸ na Figura 18-10), formando arginina e fumarato; este último é convertido em malato e a seguir entra na mitocôndria para unir-se aos intermediários do ciclo do ácido cítrico. Esse passo é a única reação reversível do ciclo da ureia. Na última etapa do ciclo (etapa ❹), a enzima citosólica **arginase** cliva a arginina, produzindo **ureia** e ornitina. A ornitina é transportada para a mitocôndria para iniciar outra volta do ciclo da ureia.

Como foi observado no Capítulo 16, as enzimas de muitas vias metabólicas encontram-se agrupadas (p. 636), com o produto de uma reação enzimática sendo canalizado diretamente para a próxima enzima da via. No ciclo da ureia, as enzimas mitocondriais e citosólicas parecem estar agrupadas dessa forma. A citrulina transportada para fora da mitocôndria não é diluída no conjunto geral de metabólitos no citosol, mas passa diretamente para o sítio ativo da arginino-succinato-sintetase. Essa canalização entre enzimas continua para o arginino-succinato, a arginina e a ornitina. Apenas a ureia é liberada para o conjunto geral de metabólitos no citosol.

## Os ciclos do ácido cítrico e da ureia podem ser ligados

Uma vez que o fumarato produzido na reação da arginino-succinase também é um intermediário do ciclo do ácido cítrico, os ciclos estão, a princípio, interconectados – em processo apelidado de "bicicleta de Krebs" (**Figura 18-12**). Contudo, cada ciclo opera independentemente e a comunicação entre eles depende do transporte de intermediários-chave entre a mitocôndria e o citosol. Os principais transportadores na membrana interna da mitocôndria incluem o transportador malato-$\alpha$-cetoglutarato, o transportador glutamato-aspartato e o transportador glutamato-$OH^-$. Jun-

(a)

ATP + Bicarbonato → ❶ O bicarbonato é fosforilado pelo ATP. → Anidrido carbônico-ácido fosfórico → ❷ A amônia desloca o grupo fosforila, gerando carbamato. → Carbamato → ❸ O carbamato é fosforilado, produzindo carbamoil-fosfato. → Carbamoil-fosfato

(b)

ATP + Citrulina → ❶ Um rearranjo leva à adição de AMP, ativando o oxigênio da carbonila da citrulina. ($PP_i$) → Citrulil-AMP + Aspartato → ❷ A adição de aspartato é facilitada pelo deslocamento do AMP. (AMP) → Arginino-succinato

**MECANISMO – FIGURA 18-11 Reações que captam nitrogênio no ciclo da ureia.** Os átomos de nitrogênio da ureia são obtidos por meio de duas reações que necessitam de ATP. **(a)** Na reação catalisada pela carbamoil-fosfato-sintetase I, entra o primeiro átomo de nitrogênio, sob a forma de amônia. Os grupos fosfato terminais de duas moléculas de ATP são utilizados para formar uma molécula de carbamoil-fosfato. Em outras palavras, essa reação apresenta dois passos de ativação (❶ e ❸). **Mecanismo da carbamoil-fosfato sintetase** **(b)** Na reação catalisada pela arginino-succinato-sintetase, o segundo nitrogênio entra no ciclo, a partir do aspartato. A ativação do oxigênio do grupo ureído da citrulina no passo ❶ prepara o composto para a adição do aspartato, no passo ❷. **Mecanismo da arginino-succinato sintetase**

tos, esses transportadores facilitam o movimento do malato e do glutamato para dentro da matriz mitocondrial e o movimento do aspartato e do $\alpha$-cetoglutarato para fora da mitocôndria, rumo ao citosol.

Diversas enzimas do ciclo do ácido cítrico, incluindo a fumarase (fumarato-hidratase) e a malato-desidrogenase (p. 647), também estão presentes como isoenzimas no citosol. Não há um transportador para levar diretamente o fumarato gerado na síntese de arginina no citosol para a matriz mitocondrial. Contudo, o fumarato pode ser convertido em malato no citosol, e depois esses intermediários podem ser metabolizados no citosol ou o malato pode ser transportado para o interior da mitocôndria, para utilização no ciclo do ácido cítrico. O aspartato formado na mitocôndria por transaminação entre o oxaloacetato e o glutamato pode ser transportado para o citosol, onde atua como doador de nitrogênio na reação do ciclo da ureia catalisada pela argininosuccinato-sintetase. Essas reações, que constituem a **lançadeira aspartato-arginino-succinato**, fornecem elos metabólicos entre essas vias separadas, pelos quais os grupos amino e os esqueletos de carbono dos aminoácidos são processados.

O uso do aspartato como doador de nitrogênio no ciclo da ureia pode parecer uma forma relativamente complicada de introduzir o segundo grupo amino na ureia. Contudo, será visto no Capítulo 22 que essa via para a incorporação do nitrogênio é uma das duas formas mais comuns de introduzir grupos amino na biossíntese de moléculas que os contenham. No ciclo da ureia, outras interconexões entre vias podem ajudar a explicar a razão pela qual o aspartato é utilizado como doador de nitrogênio. Os ciclos da ureia e do ácido cítrico estão fortemente unidos a um processo adicional, que traz o NADH na forma de equivalentes redutores para dentro da mitocôndria. Como detalhado no próximo capítulo, o NADH produzido pela glicólise, pela oxidação de ácidos graxos e em outros processos não pode ser transportado através da membrana mitocondrial interna. Contudo, equivalentes redutores podem entrar na mitocôndria pela conversão de aspartato em oxaloacetato no citosol e utilizando o NADH para reduzir o oxaloacetato a malato, o qual é então transportado para a matriz mitocondrial via transportador malato-$\alpha$-cetoglutarato. Uma vez dentro da mitocôndria, o malato pode ser convertido novamente em oxaloacetato, ao mesmo tempo em que gera NADH. O oxaloacetato é convertido em aspartato na matriz e transportado para fora da mitocôndria pelo transportador aspartato-glutamato. Essa lançadeira de elétrons malato-aspartato completa novo ci-

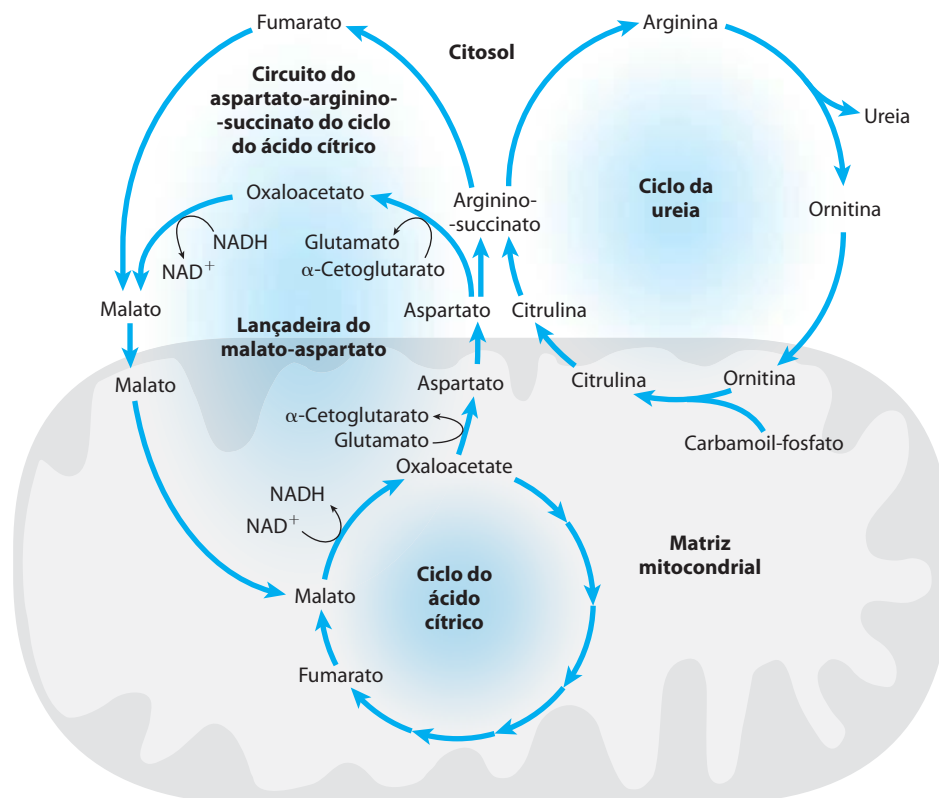



**FIGURA 18-12 Vínculos entre o ciclo da ureia e o ciclo do ácido cítrico.** Esses dois ciclos interconectados têm sido denominados "bicicleta de Krebs". As vias que unem o ciclo do ácido cítrico ao ciclo da ureia são conhecidas como lançadeira do aspartato-arginino-succinato; elas unem efetivamente os destinos dos grupos amino e dos esqueletos de carbono dos aminoácidos. As interconexões são bastante elaboradas. Por exemplo, algumas enzimas do ciclo do ácido cítrico, como a fumarase e a malato-desidrogenase, apresentam isoenzimas citosólicas e mitocondriais. O fumarato produzido no citosol, seja no ciclo da ureia, na biossíntese de purinas ou em outros processos, pode ser convertido em malato citosólico, utilizado no citosol ou transportado para a mitocôndria para entrar no ciclo do ácido cítrico. Esses processos são ainda interligados com a lançadeira do malato-aspartato, conjunto de reações que traz equivalentes redutores para a mitocôndria (ver também Figura 19-31). Esses diferentes ciclos ou processos contam com um número limitado de transportadores na membrana mitocondrial interna.

clo, que funciona mantendo a mitocôndria com suprimento de NADH (ver Figura 19-31).

Esses processos exigem que as concentrações de glutamato e aspartato sejam mantidas em equilíbrio no citosol. A enzima que transfere grupos amino entre esses dois aminoácidos-chave é a aspartato-aminotransferase, AST (também chamada transaminase glutâmico-oxalacética, TGO). Essa enzima está entre as mais ativas enzimas nos hepatócitos e em outros tecidos. Quando ocorre lesão tecidual, essa enzima (cuja atividade é facilmente mensurável) e outras vazam para a circulação sanguínea. Assim, a avaliação dos níveis sanguíneos de enzimas hepáticas é importante para o diagnóstico de várias condições médicas (Quadro 18-1).

## A atividade do ciclo da ureia é regulada em dois níveis

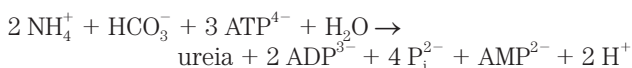
O fluxo de nitrogênio no ciclo da ureia em determinado animal varia com a dieta. Quando a ingestão dietética é basicamente proteica, os esqueletos de carbono dos aminoácidos são utilizados como combustível, produzindo muita ureia a partir dos grupos amino excedentes. Durante o jejum prolongado, quando a degradação de proteína muscular começa a suprir boa parte da energia metabólica do organismo, a produção de ureia também aumenta significativamente.

Essas alterações de demanda com relação à atividade do ciclo da ureia são realizadas, a longo prazo, pela regulação das velocidades de síntese das quatro enzimas do ciclo da ureia e da carbamoil-fosfato-sintetase I, no fígado. Essas cinco enzimas são sintetizadas em taxas mais altas em animais em jejum e em animais com dietas de alto conteúdo proteico, em comparação a animais alimentados cujas dietas contenham principalmente carboidratos e gorduras. Animais com dietas desprovidas de proteínas produzem níveis mais baixos das enzimas do ciclo da ureia.

Em uma escala de tempo mais curta, a regulação alostérica de pelo menos uma enzima-chave ajusta o fluxo pelo ciclo da ureia. A primeira enzima da via, a carbamoil-fosfato-sintetase I, é ativada alostericamente por ***N*-acetil-glutamato**, sintetizado a partir de acetil-CoA e glutamato pela ***N*-acetil-glutamato-sintase** (**Figura 18-13**). Em vegetais e microrganismos, essa enzima catalisa a primeira etapa na síntese *de novo* de arginina a partir do glutamato (ver Figura 22-12), mas, nos mamíferos, a atividade da *N*-acetil-glutamato-sintase no fígado exerce função puramente reguladora (os mamíferos não têm as demais enzimas necessárias para a conversão de glutamato em arginina). Os níveis estacionários de *N*-acetil-glutamato são determinados pelas concentrações de glutamato e acetil-CoA (os substratos da *N*-acetil-glutamato-sintase) e arginina (ativador da *N*-acetil-glutamato-sintase e, portanto, ativador do ciclo da ureia).

## A interconexão de vias reduz o custo energético da síntese da ureia

Analisando o ciclo da ureia isoladamente, percebe-se que a síntese de uma molécula de ureia requer a hidrólise de quatro ligações fosfato ricas em energia (Figura 18-10). Duas moléculas de ATP são necessárias na formação do carbamoil-fosfato e um ATP para produzir arginino-succinato – este último ATP sendo clivado em AMP e $PP_i$, que é hidrolisado em 2 $P_i$. A equação geral do ciclo da ureia é

$$2\ NH_4^+ + HCO_3^- + 3\ ATP^{4-} + H_2O \rightarrow \text{ureia} + 2\ ADP^{3-} + 4\ P_i^{2-} + AMP^{2-} + 2\ H^+$$

**QUADRO 18-1**  **MEDICINA** **Ensaios para avaliar lesão tecidual**

A análise de certas atividades enzimáticas no soro sanguíneo fornece informações valiosas para o diagnóstico de diversas condições patológicas.

A alanina-aminotransferase (ALT; também denominada transaminase glutâmico-pirúvica, TGP) e a aspartato-aminotransferase (AST; também denominada transaminase glutâmico-oxaloacética, TGO) são importantes para o diagnóstico de lesões cardíacas ou hepáticas causadas por infarto do miocárdio, toxicidade por drogas ou infecções. Após um infarto, várias enzimas, incluindo essas transaminases, "vazam" das células cardíacas lesionadas para a corrente sanguínea. Medidas das atividades séricas dessas duas transaminases pelos testes STGP e STGO (S de soro), e de outra enzima, a **creatina-cinase**, pelo teste SCK, podem fornecer informações sobre a gravidade da lesão. A creatina-cinase é a primeira enzima cardíaca a aparecer no sangue após um infarto; ela também desaparece rapidamente do sangue. A TGO é a próxima a surgir e a TGP aumenta posteriormente. A lactato-desidrogenase também pode vazar do músculo cardíaco lesionado ou anaeróbio.

Esses testes (STGP e STGO) de avaliação das atividades das transaminases no soro também são importantes em medicina ocupacional, para se determinar se pessoas expostas a tetracloreto de carbono, clorofórmio ou outros solventes industriais sofreram lesão hepática. A degeneração hepática causada por esses solventes é acompanhada pelo surgimento de várias atividades enzimáticas no sangue, originárias dos hepatócitos lesionados. As aminotransferases são muito úteis no monitoramento de pessoas expostas a essas substâncias químicas, pois essas atividades enzimáticas são altas no fígado e, assim sendo, provavelmente estarão entre as proteínas liberadas dos hepatócitos lesionados; além disso, elas podem ser detectadas no sangue em quantidades muito pequenas.

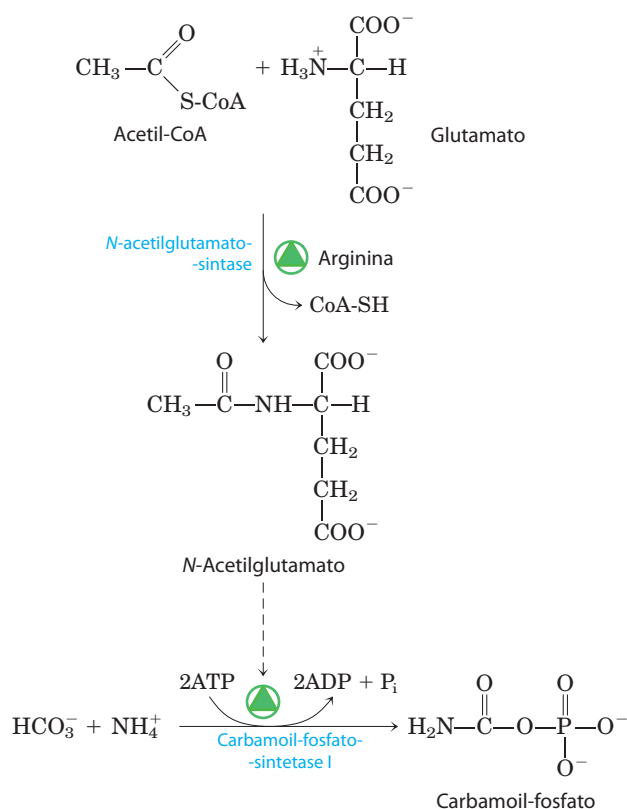



**FIGURA 18-13 Síntese de *N*-acetilglutamato e ativação da carbamoil--fosfato-sintetase I por esse composto.**

Contudo, esse aparente custo é reduzido pelas interconexões detalhadas acima. O fumarato, gerado pelo ciclo da ureia, é convertido em malato e este transportado para dentro da mitocôndria (Figura 18-12). Dentro da matriz mitocondrial, NADH é gerado na reação da malato desidrogenase. Cada molécula de NADH pode gerar até 2,5 ATP durante a respiração mitocondrial (Capítulo 19), reduzindo muito o custo energético geral da síntese de ureia.

## Defeitos genéticos do ciclo da ureia podem ser fatais

Pessoas com defeitos genéticos em qualquer das enzimas envolvidas na formação de ureia não toleram dietas ricas em proteína. Os aminoácidos ingeridos em excesso, além das necessidades mínimas diárias para a síntese proteica, são desaminados no fígado, produzindo amônia livre, que não pode ser convertida em ureia para ser exportada para a corrente sanguínea e, como já foi frisado, a amônia é altamente tóxica. A ausência de uma enzima do ciclo da ureia pode resultar em hiperamonemia ou no aumento de um ou mais intermediários do ciclo da ureia, dependendo da enzima que estiver faltando. Uma vez que a maioria das etapas do ciclo da ureia é irreversível, a ausência de uma atividade enzimática frequentemente pode ser identificada pela determinação de qual intermediário do ciclo está presente em concentrações especialmente altas no sangue e/ou na urina. Embora a degradação dos aminoácidos possa apresentar sérios problemas para a saúde das pessoas com deficiências no ciclo da ureia, uma dieta desprovida de proteínas não é uma opção de tratamento. Humanos são incapazes de sintetizar metade dos vinte aminoácidos proteicos, e esses **aminoácidos essenciais** (Tabela 18-1) devem estar presentes na dieta.

Uma variedade de tratamentos é disponibilizada para pessoas com defeitos no ciclo da ureia. A administração cuidadosa na dieta dos ácidos aromáticos benzoato ou fenilbutirato pode ajudar a diminuir os níveis de amônia no sangue. O benzoato é convertido em benzoil-CoA, que se combina com a glicina, formando hipurato (**Figura 18-14**, à esquerda). A glicina utilizada nessa reação deve ser regenerada, e a amônia é captada pela reação da glicina-sintase. O fenilbutirato é convertido em fenilacetato pela $\beta$-oxidação. O fenilacetato é então convertido em fenilacetil-CoA, que se combina com a glutamina, formando fenilacetilglutamina (Figura 18-14, à direita). A resultante remoção de glutamina desencadeia um aumento em sua síntese pela glutamina--sintetase (ver Equação 22-1), em uma reação que capta amônia. Tanto o hipurato quanto a fenilacetilglutamina são compostos não tóxicos e são excretados na urina. As vias mostradas na Figura 18-14 constituem apenas contribuições secundárias ao metabolismo normal, mas tornam-se proeminentes quando ácidos aromáticos são ingeridos.

Outras terapias são mais específicas para determinada deficiência enzimática. A deficiência de *N*-acetilglutamato--sintase resulta na ausência do ativador normal para a carbamoil-fosfato-sintetase I (Figura 18-13). Essa condição pode ser tratada pela administração de carbamoil-glutamato, um análogo do *N*-acetilglutamato, que ativa efetivamente a carbamoil-fosfato-sintetase I.

**TABELA 18-1** Aminoácidos essenciais e não essenciais para humanos e para ratos albinos

| Não essenciais | Essenciais condicionais* | Essenciais |
|---|---|---|
| Alanina | Arginina | Histidina |
| Asparagina | Cisteína | Isoleucina |
| Aspartato | Glutamina | Leucina |
| Glutamato | Glicina | Lisina |
| Serina | Prolina | Metionina |
| | Tirosina | Fenilalanina |
| | | Treonina |
| | | Triptofano |
| | | Valina |

*Necessários em certo grau para animais jovens em crescimento e/ou durante certas patologias.

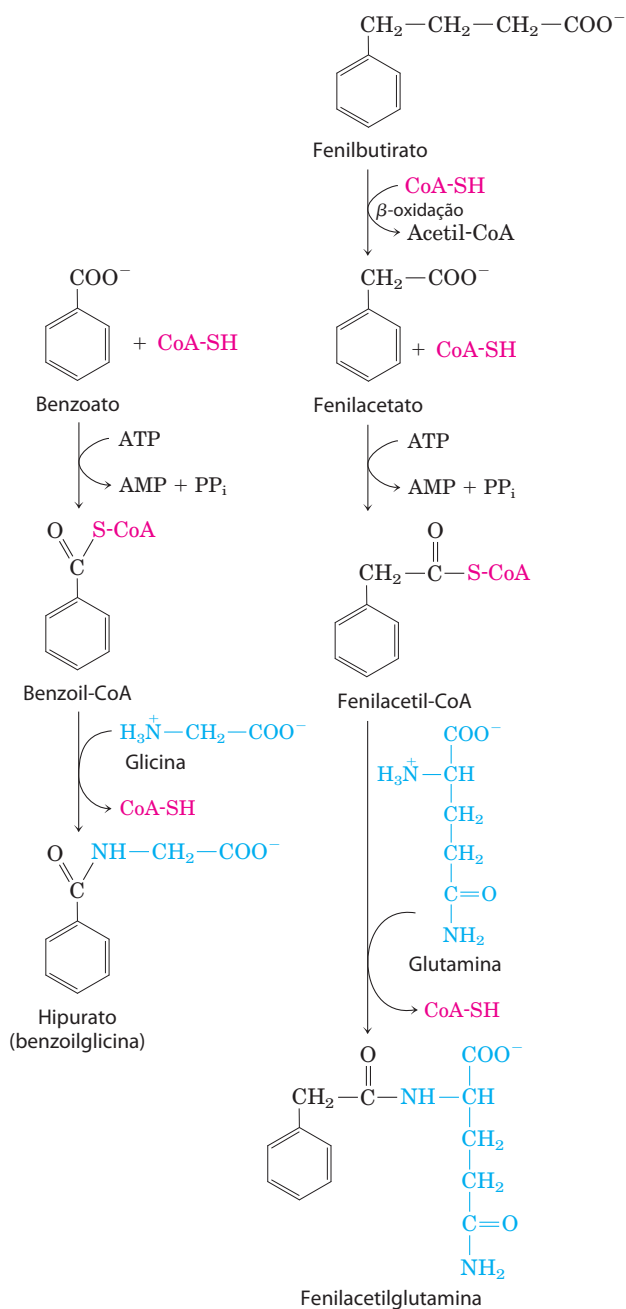
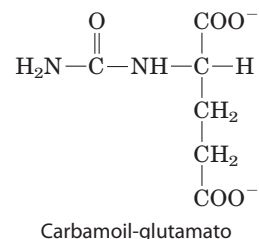



**FIGURA 18-14 Tratamento para deficiências em enzimas do ciclo da ureia.** Os ácidos aromáticos benzoico e fenilbutírico, administrados na dieta, são metabolizados e se combinam com a glicina e com a glutamina, respectivamente. Os produtos são excretados na urina. A síntese subsequente de glicina e de glutamina para repor esses intermediários remove a amônia da corrente sanguínea.



A suplementação da dieta com arginina é útil no tratamento de deficiências de ornitina-transcarbamoilase, arginino-succinato-sintetase e de arginino-succinase. Muitos desses tratamentos devem ser acompanhados por controle dietético rígido e suplementação de aminoácidos essenciais. Nos raros casos de deficiência de arginase, a arginina, substrato da enzima defeituosa, deve ser suprimida da dieta. ■

### RESUMO 18.2 Excreção de nitrogênio e o ciclo da ureia

- A amônia é altamente tóxica para os tecidos animais. No ciclo da ureia, a ornitina combina-se com a amônia, na forma de carbamoil-fosfato, para formar citrulina. Um segundo grupo amino é transferido para a citrulina a partir do aspartato, para formar arginina – o precursor imediato da ureia. A arginase catalisa a hidrólise da arginina em ureia e ornitina; assim, a ornitina é regenerada a cada volta do ciclo.
- O ciclo da ureia resulta na conversão líquida de oxaloacetato em fumarato, ambos intermediários do ciclo do ácido cítrico. Desse modo, os dois ciclos estão interconectados.
- A atividade do ciclo da ureia é regulada no nível de síntese de suas enzimas e por regulação alostérica da enzima que catalisa a formação de carbamoil-fosfato.

## 18.3 Vias da degradação dos aminoácidos

As vias do catabolismo dos aminoácidos, em conjunto, representam normalmente apenas 10 a 15% da produção de energia no organismo humano; essas vias são bem menos ativas que a glicólise e a oxidação dos ácidos graxos. O fluxo ao longo das vias catabólicas também varia muito, dependendo do equilíbrio entre as necessidades para processos biossintéticos e a disponibilidade de determinado aminoácido. As 20 vias catabólicas convergem para formar apenas seis produtos principais, os quais podem entrar no ciclo do ácido cítrico (**Figura 18-15**). Desse ponto, os esqueletos de carbono tomam vias distintas, sendo direcionados para a gliconeogênese ou para a cetogênese, ou oxidados completamente a $CO_2$ e $H_2O$.

Sete dos aminoácidos podem ter seus esqueletos de carbono, total ou parcialmente, degradados para produzir acetil-CoA. Cinco aminoácidos são convertidos em $\alpha$-cetoglutarato, quatro em succinil-CoA, dois em fumarato e dois em oxaloacetato. Seis aminoácidos têm seu esqueleto carbonado, total ou parcialmente, convertido em piruvato, o qual

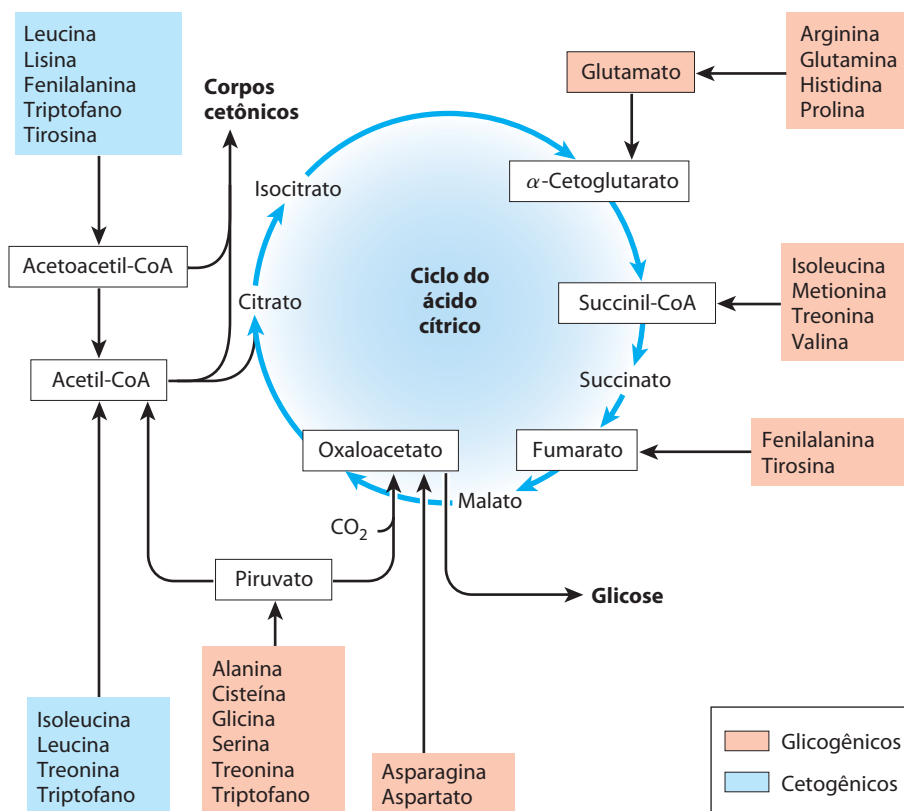



**FIGURA 18-15 Resumo do catabolismo dos aminoácidos.** Os aminoácidos estão agrupados conforme seu principal produto final de degradação. Alguns aminoácidos estão listados mais de uma vez, pois diferentes partes de seus esqueletos de carbono são degradadas em diferentes produtos finais. A figura mostra as vias catabólicas mais importantes em vertebrados; há, contudo, variações menores entre diferentes espécies de vertebrados. A treonina, por exemplo, é degradada por no mínimo duas vias diferentes (ver Figuras 18-19 e 18-27), e a importância de determinada via pode variar com o organismo e as condições metabólicas. Aminoácidos glicogênicos e cetogênicos também estão delineados na figura, sombreados em cores. Observe que cinco aminoácidos são tanto glicogênicos quanto cetogênicos. Os aminoácidos que produzem piruvato também são potencialmente cetogênicos. Apenas dois aminoácidos, lisina e leucina, são exclusivamente cetogênicos.

pode ser transformado em acetil-CoA ou em oxaloacetato. Posteriormente, serão resumidas as vias individuais para os 20 aminoácidos em diagramas de fluxo, cada um levando a um ponto específico de entrada no ciclo do ácido cítrico. Nesses diagramas, os átomos de carbono que entram no ciclo do ácido cítrico são mostrados coloridos. Observe que alguns aminoácidos aparecem mais de uma vez, refletindo diferentes destinos para diferentes partes de seus esqueletos de carbono. Em vez de examinar cada etapa de cada via no catabolismo dos aminoácidos, serão destacadas para uma discussão especial algumas reações enzimáticas de relevância particular, devido a seus mecanismos ou seu significado médico.

## Alguns aminoácidos são convertidos em glicose, outros em corpos cetônicos

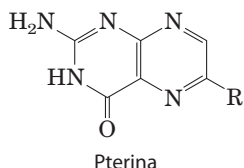
Os sete aminoácidos inteira ou parcialmente degradados em acetoacetil-CoA e/ou acetil-CoA – fenilalanina, tirosina, isoleucina, leucina, triptofano, treonina e lisina – podem produzir corpos cetônicos no fígado, onde a acetoacetil-CoA é convertida em acetoacetato e, então, em acetona e β-hidroxibutirato (ver Figura 17-19). Esses são aminoácidos **cetogênicos** (Figura 18-15). Sua capacidade de produzir corpos cetônicos é especialmente evidente no diabetes melito não controlado, quando o fígado produz grandes quantidades de corpos cetônicos a partir de ácidos graxos e de aminoácidos cetogênicos.

Os aminoácidos degradados em piruvato, α-cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato e/ou oxaloacetato podem ser convertidos em glicose e glicogênio pelas vias descritas nos Capítulos 14 e 15. Esses são aminoácidos **glicogênicos**. Aminoácidos glicogênicos e cetogênicos não são excludentes entre si; cinco aminoácidos – triptofano, fenilalanina, tirosina, treonina e isoleucina – são tanto cetogênicos quanto glicogênicos. O catabolismo dos aminoácidos é especialmente crítico para a sobrevivência de animais em dietas ricas em proteína ou durante o jejum. A leucina é um aminoácido exclusivamente cetogênico, muito comum em proteínas. Sua degradação contribui substancialmente para a cetose em condições de jejum prolongado.

## Diversos cofatores enzimáticos desempenham papéis importantes no catabolismo dos aminoácidos

Uma variedade de rearranjos químicos interessantes ocorrem nas vias catabólicas dos aminoácidos. Será útil começar o estudo dessas vias observando classes de reações recorrentes e apresentar seus cofatores enzimáticos. Já foi abordada uma importante classe: as reações de transaminação que necessitam de pirodoxal-fosfato. Outro tipo comum de reação que ocorre no catabolismo dos aminoácidos são as transferências de grupos de um carbono, as quais, em geral, envolvem um de três possíveis cofatores: a biotina, o tetra-hidrofolato ou a *S*-adenosilmetionina (**Figura 18-16**). Esses cofatores transferem grupos de um carbono em diferentes estados de oxidação: a biotina transfere grupos de um carbono em seu estado mais oxidado, $CO_2$ (ver Figura 14-19); o tetra-hidrofolato transfere grupos de um carbono em estados intermediários de oxidação e, algumas vezes, como grupos metila; e a *S*-adenosilmetionina transfere grupos metila, o estado mais reduzido do carbono. Os últimos dois cofatores são especialmente importantes para o metabolismo dos aminoácidos e dos nucleotídeos.

A molécula do **tetra-hidrofolato** (**$H_4$-folato**), sintetizada em bactérias, consiste em três porções: pterina substituída (6-metilpterina), *p*-aminobenzoato e glutamato (Figura 18-16).

Pterina

A forma oxidada, o folato, é uma vitamina para os mamíferos, sendo convertida, por meio de duas etapas, em tetraidrofolato, pela ação da enzima di-hidrofolato-redutase. O grupo de um carbono a ser transferido, em qualquer dos três estados possíveis de oxidação, e está ligado ao N-5, ou ao N-10 ou a ambos. A forma mais reduzida do cofator carrega um grupo metila, uma forma mais oxidada carrega um grupo metileno e a forma ainda mais oxidada carrega um grupo metenila, formila ou formimino (**Figura 18-17**). As formas de tetra-hidrofolato são, em sua maioria, interconversíveis, funcionando como doadores de unidades de um carbono em uma grande variedade de reações metabólicas. A fonte principal de unidades de um carbono para o tetra-hidrofolato é o carbono removido da serina, em sua conversão em glicina, produzindo $N^5,N^{10}$-metilenotetra-hidrofolato.

Embora o tetra-hidrofolato possa carregar um grupo metila em seu N-5, o potencial de transferência desse grupo metila é insuficiente para a maioria das reações biossintéticas. A ***S*-adenosilmetionina** (**adoMet**) é o cofator preferido para transferências biológicas do grupo metila. Esse cofator é sintetizado a partir do ATP e da metionina na reação catalisada pela **metionina-adenosil-transferase** (**Figura 18-18**, etapa ❶). Essa reação é incomum, pelo fato de o átomo de enxofre nucleofílico da metionina atacar o carbono 5′ da ribose do ATP, em vez de atacar um dos átomos de fósforo. O trifosfato é liberado e clivado em $P_i$ e $PP_i$ pela enzima e o $PP_i$ é hidrolisado pela pirofosfatase inorgânica. Desse modo, três ligações são quebradas nessa reação, incluindo duas ligações de alta energia de grupos fosfato. A única outra reação conhecida na qual o trifosfato é deslocado do ATP ocorre na síntese da coenzima $B_{12}$ (ver Quadro 17-2, Figura 3).

A *S*-adenosilmetionina é um potente agente alquilante, em virtude de seu íon sulfônio desestabilizado. O grupo metila está sujeito ao ataque de nucleófilos, sendo cerca de 1.000 vezes mais reativo que o grupo metila do $N^5$-metiltetra-hidrofolato.

A transferência do grupo metila da *S*-adenosilmetionina para um aceptor produz ***S*-adenosil-homocisteína** (Figura 18-18, etapa ❷), posteriormente degradada em homocisteína e adenosina (etapa ❸). A metionina é regenerada pela transferência de um grupo metila para a homocisteína, em reação catalisada pela metionina-sintase (etapa ❹), e a metionina é novamente convertida em *S*-adenosilmetionina para completar um ciclo de ativação da metila.

Uma forma de metionina-sintase comum em bactérias utiliza $N^5$-metiltetra-hidrofolato como doador da metila. Outra forma dessa enzima, presente em algumas bactérias

Valerato
Biotina
*p*-aminobenzoato
6-metilpterina
Glutamato
Tetra-hidrofolato ($H_4$ folato)
Metionina
adenosina
*S*-Adenosilmetionina (adoMet)

**FIGURA 18-16 Alguns cofatores enzimáticos importantes em reações de transferência de um carbono.** Os átomos de nitrogênio aos quais os grupos de um carbono são ligados ao tetra-hidrofolato estão mostrados em azul.

**FIGURA 18-17 Conversões de unidades de um carbono ligadas ao tetra-hidrofolato.** As diferentes espécies moleculares estão agrupadas de acordo com seu estado de oxidação, com as mais reduzidas na parte superior e as mais oxidadas na parte inferior da figura. Todas as espécies dentro de um único quadro sombreado estão no mesmo estado de oxidação. A conversão de $N^5$,$N^{10}$-metilenotetra-hidrofolato em $N^5$-metiltetra-hidrofolato é efetivamente irreversível. A transferência enzimática de grupos formila, como na síntese das purinas (ver Figura 22-35) e na formação de formilmetionina nas bactérias (Capítulo 27), geralmente utiliza $N^{10}$-formiltetra-hidrofolato, em vez de $N^5$-formiltetra-hidrofolato. Este último é significativamente mais estável e, portanto, um doador menos eficiente de grupos formila. O $N^5$-formiltetra-hidrofolato é um produto colateral na reação da ciclo-hidrolase e também pode se formar espontâneamente. A conversão de $N^5$-formiltetra-hidrofolato em $N^5$,$N^{10}$-meteniltetra-hidrofolato requer ATP, pois de outra forma o equilíbrio dessa reação seria desfavorável. Observe que o $N^5$-formiminotetra-hidrofolato é derivado da histidina, em uma via mostrada na Figura 18-26.

e nos mamíferos, utiliza $N^5$-metiltetra-hidrofolato, porém o grupo metila é inicialmente transferido para a cobalamina, derivada da vitamina $B_{12}$, formando metilcobalamina, usada como doadora da metila para a formação da metionina. Essa reação e o rearranjo da L-metilmalonil-CoA para produzir succinil-CoA (ver Quadro 17-2, Figura Q-1a) são as duas únicas reações conhecidas que são dependentes da coenzima $B_{12}$ nos mamíferos.

As vitaminas $B_{12}$ e folato estão fortemente relacionadas nessas vias metabólicas. A doença causada por

**FIGURA 18-18 Síntese de metionina e de *S*-adenosilmetionina em um ciclo de ativação de grupo metila.** Os passos são descritos no texto. Na reação da metionina-sintase (etapa ❹), o grupo metila é transferido para a cobalamina, formando metilcobalamina, que, por sua vez, é doador da metila na formação da metionina. A *S*-adenosilmetionina, que apresenta um enxofre carregado positivamente (sendo, portanto, um íon sulfônio), é um poderoso agente metilante em diversas reações biossintéticas. O aceptor do grupo metila (etapa ❷) é designado R.

deficiência de vitamina $B_{12}$, a **anemia perniciosa**, é rara, sendo observada apenas em pessoas com defeitos nas vias para absorção intestinal dessa vitamina (ver Quadro 17-2) ou em vegetarianos estritos (a vitamina $B_{12}$ não está presente em plantas). A doença progride vagarosamente, pois apenas quantidades pequenas de vitamina $B_{12}$ são necessárias e os depósitos normais dessa vitamina no fígado podem durar de três a cinco anos. Os sintomas incluem, além da anemia, vários distúrbios neurológicos.

A anemia pode ser seguida até a reação da metionina-sintase. Como já mencionado, o grupo metila da metilcobalamina origina-se do $N^5$-metiltetra-hidrofolato e essa é a única reação que utiliza $N^5$-metiltetra-hidrofolato nos mamíferos. A reação que converte a forma $N^5$,$N^{10}$-metileno na forma $N^5$-metila do tetra-hidrofolato é irreversível (Figura 18-17). Assim sendo, se a coenzima $B_{12}$ não estiver disponível para a síntese de metilcobalamina, o folato metabólico é mantido na forma $N^5$-metila. A anemia associada com a deficiência de vitamina $B_{12}$ é denominada **anemia megaloblástica**. Suas manifestações incluem uma redução na produção de eritrócitos (as células vermelhas do sangue) maduros e o aparecimento, na medula óssea, de células precursoras imaturas, os **megaloblastos**. Os eritrócitos normais são gradualmente substituídos, no sangue, por um número menor de eritrócitos anormalmente grandes, denominados **macrócitos**. O defeito no desenvolvimento eritrocitário é consequência direta da depleção de $N^5$,$N^{10}$-metilenotetra-hidrofolato, necessário para a síntese de nucleotídeos da timidina, utilizados na síntese de DNA (ver Capítulo 22). A deficiência de folato, na qual todas as formas de tetra-hidrofolato estão depletadas, também leva à anemia, basicamente pelas mesmas razões. Os sintomas da anemia pela deficiência de vitamina $B_{12}$ podem ser atenuados pela administração tanto de vitamina $B_{12}$ quanto de folato.

É perigoso, contudo, tratar a anemia perniciosa com a suplementação de folato apenas, pois os sintomas neurológicos da deficiência de vitamina $B_{12}$ progredirão. Esses sintomas não surgem da deficiência na reação da metionina-sintase. O prejuízo na atividade da metilmalonil-CoA-mutase (ver Quadro 17-2 e Figura 17-12) causa acúmulo de ácidos graxos incomuns, com número ímpar de carbonos, nas membranas neuronais. Portanto, a anemia associada com a deficiência de folato é frequentemente tratada com a administração de ambos, folato e vitamina $B_{12}$, ao menos até que a origem metabólica da anemia esteja claramente definida. O diagnóstico precoce de deficiência de vitamina $B_{12}$ é importante, pois algumas condições neurológicas a ela associadas podem ser irreversíveis.

A deficiência de folato também diminui a disponibilidade de $N^5$-metiltetra-hidrofolato, necessário para a função da metionina-sintase. Isso leva a um aumento nos níveis de homocisteína no sangue, condição relacionada com doença cardíaca, hipertensão e acidente vascular cerebral. Níveis elevados de homocisteína podem ser responsáveis por 10% de todos os casos de doença cardíaca. Essa condição é tratada com suplementação com folato. ■

A **tetra-hidrobiopterina**, outro cofator utilizado no catabolismo dos aminoácidos, é semelhante à porção pterina do tetra-hidrofolato, mas não está envolvida em reações de transferência de grupos de um carbono e, sim, em reações de oxidação. Seu modo de ação será abordado quando for discutida a degradação da fenilalanina (ver Figura 18-24).

## Seis aminoácidos são degradados até piruvato

Os esqueletos de carbono de seis aminoácidos são convertidos, total ou parcialmente, em piruvato. O piruvato pode então ser convertido em acetil-CoA e, por fim, oxidado via ciclo do ácido cítrico ou ser convertido em oxaloacetato e encaminhado para a gliconeogênese. Os seis aminoácidos são a alanina, o triptofano, a cisteína, a serina, a glicina e a treonina (**Figura 18-19**). A **alanina** produz piruvato diretamente, por transaminação com o $\alpha$-cetoglutarato, e a cadeia lateral do **triptofano** é clivada, produzindo alanina e, portanto, piruvato. A **cisteína** é convertida em piruvato por meio de duas etapas; inicialmente é removido o átomo de enxofre e a seguir ocorre uma transaminação. A **serina** é convertida em piruvato pela serina-desidratase. Tanto o grupo hidroxila do carbono $\beta$ quanto o grupo $\alpha$-amino da serina são removidos nessa única reação, que é dependente de piridoxal-fosfato (**Figura 18-20a**).

A **glicina** pode ser degradada por meio de três vias, apenas uma delas produzindo piruvato. A glicina é convertida em serina pela adição enzimática de um grupo hidroximetila (Figuras 18-19 e 18-20b). Essa reação, catalisada pela **serina-hidroximetil-transferase**, requer as coenzimas tetra-hidrofolato e piridoxal-fosfato. A serina é convertida em piruvato, como descrito anteriormente. Na segunda via, que predomina nos animais, a glicina sofre clivagem oxidativa, produzindo $CO_2$, $NH_4^+$ e um grupo metileno ($—CH_2—$) (Figuras 18-19 e 18-20c). Essa reação, facilmente reversível, catalisada pela **enzima de clivagem da glicina** (também denominada glicina-sintase), também requer tetra-hidrofolato, que recebe o grupo metileno. Nessa via de clivagem oxidativa, os dois átomos de carbono da glicina não entram no ciclo do ácido cítrico. Um carbono é perdido como $CO_2$ e o outro se torna o grupo metileno do $N^5$, $N^{10}$-metilenotetra-hidrofolato (Figura 18-17), doador de grupos de um carbono em certas vias biossintéticas.

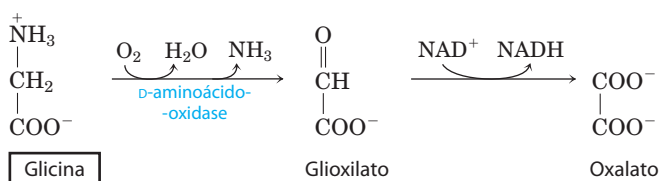
**FIGURA 18-19 Vias catabólicas para alanina, glicina, serina, cisteína, triptofano e treonina.** O destino do grupo indol do triptofano é mostrado na Figura 18-21. Detalhes da maioria das reações envolvendo a serina e a glicina são mostrados na Figura 18-20. As vias aqui mostradas para a degradação da treonina são responsáveis por apenas cerca de um terço do catabolismo da treonina (para a via alternativa, ver Figura 18-27). Diversas vias de degradação da cisteína levam ao piruvato. O enxofre da cisteína pode ter diversos destinos alternativos, um dos quais está mostrado na Figura 22-17. Os átomos de carbono nesta figura e nas seguintes são mostrados em um código de cores, para permitir acompanhar seus destinos.

Treonina
Treonina-desidrogenase
$NAD^+$
NADH
2-Amino-3-cetobutirato
2-amino-3-cetobutirato-CoA-ligase
CoA
Acetil-CoA
Glicina
$NAD^+$ NADH
$CO_2 + NH_4^+$
Enzima de clivagem da glicina
Serina-hidroximetil-transferase
$N^5$, $N^{10}$-metileno $H_4$ folato
PLP
$H_4$ folato
Serina
Serina-desidratase
PLP
$H_2O$
$H_2O$
$NH_4^+$
Triptofano
4 etapas
Alanina
Alanina-aminotransferase
PLP
$\alpha$-Cetoglutarato
Glutamato
Piruvato
2 etapas
Cisteína

**MECANISMO – FIGURA 18-20 Interações entre os cofatores piridoxal-fosfato e tetra-hidrofolato no metabolismo da serina e da glicina.** A primeira etapa em cada uma dessas reações (não mostrado) envolve a formação de uma ligação covalente imina entre o PLP ligado à enzima e o aminoácido substrato da reação – serina em (a), glicina em (b) e (c). **(a)** Uma eliminação de água catalisada pelo PLP na reação da serina-desidratase (etapa ❶) inicia a via para o piruvato. **(b)** Na reação da serina-hidroximetil-transferase, um carbânion estabilizado pelo PLP (produto da etapa ❶) é um intermediário-chave na transferência reversível do grupo metileno (como $-CH_2-OH$) do $N^5,N^{10}$-metilenotetra-hidrofolato, para formar serina. **(c)** A enzima de clivagem da glicina é um complexo multienzimático, contendo os componentes P, H, T e L. A reação geral, que é reversível, converte glicina em $CO_2$ e $NH_4^+$, sendo o segundo carbono da glicina captado pelo tetra-hidrofolato para formar $N^5,N^{10}$-metilenotetra-hidrofolato. O piridoxal-fosfato ativa o carbono $\alpha$ do aminoácido em estágios críticos em todas essas reações, e o tetra-hidrofolato carrega unidades de um carbono em duas delas (ver Figuras 18-6 e 18-17).

Essa segunda via de degradação da glicina parece ser essencial para os mamíferos. Seres humanos com defeitos graves envolvendo a atividade da enzima de clivagem da glicina sofrem de uma condição conhecida como hiperglicemia não cetótica. Essa condição se caracteriza por níveis séricos elevados de glicina, levando a graves deficiências mentais e morte no início da infância. Em níveis elevados, a glicina é um neurotransmissor inibitório, o que pode explicar os efeitos neurológicos da doença. Muitos defeitos genéticos do metabolismo dos aminoácidos foram identificados em humanos (Tabela 18-2) e, ao longo deste capítulo, outros serão encontrados. ■

Na terceira e última via de degradação da glicina, a molécula não quiral da glicina é substrato para a enzima D-aminoácido-oxidase. A glicina é convertida em glioxilato, substrato alternativo para a lactato-desidrogenase hepática (p. 563). O glioxilato é oxidado produzindo oxalato, em reação dependente de $NAD^+$:

$$\underset{\text{Glicina}}{\overset{+}{N}H_3-CH_2-COO^-} \xrightarrow[\text{D-aminoácido-oxidase}]{O_2 \quad H_2O \quad NH_3} \underset{\text{Glioxilato}}{O{=}CH-COO^-} \xrightarrow{NAD^+ \quad NADH} \underset{\text{Oxalato}}{COO^--COO^-}$$

Acredita-se que a principal função da D-aminoácido-oxidase, presente em níveis elevados nos rins, seja a destoxificação de D-aminoácidos ingeridos, derivados das paredes celulares bacterianas e de alimentos grelhados (temperaturas elevadas causam racemização espontânea de L-aminoácidos presentes nas proteínas). O oxalato, seja obtido a partir da dieta ou produzido enzimaticamente nos rins, tem importância médica. Cristais de oxalato de cálcio representam até 75% de todos os cálculos renais. ■

Há duas vias significativas para a degradação da **treonina**. Uma via leva à produção de piruvato via glicina (Figura 18-19). A conversão em glicina ocorre em duas etapas, com a treonina sendo convertida em 2-amino-3-cetobutirato, pela ação da treonina-desidrogenase. Essa é uma rota de importância relativamente menor em humanos, representando 10 a 30% do catabolismo da treonina, porém mais importante em outros mamíferos. Em humanos, a rota principal leva à produção de succinil-CoA, sendo descrita posteriormente.

Em laboratório, a serina-hidroximetil-transferase catalisa a conversão de treonina em glicina e acetaldeído em uma etapa, porém essa rota não é importante para a degradação da treonina em mamíferos.

## Sete aminoácidos são degradados, produzindo acetil-CoA

Partes dos esqueletos de carbono de sete aminoácidos – **triptofano**, **lisina**, **fenilalanina**, **tirosina**, **leucina**, **isoleucina** e **treonina** – produzem acetil-CoA e/ou acetoacetil-CoA, esta última sendo convertida em acetil-CoA (**Figura 18-21**). Algumas das etapas finais das vias de degradação da leucina, da lisina e do triptofano assemelham-se a etapas da oxidação dos ácidos graxos (ver Figura 17-9). A treonina produz alguma acetil-CoA (não mostrado na Figura 18-21) através da rota secundária ilustrada na Figura 18-19.

As vias de degradação de dois desses sete aminoácidos merecem especial atenção. A degradação do triptofano é a mais complexa de todas as vias do catabolismo de aminoácidos em tecidos animais. Partes do triptofano (quatro de

**TABELA 18-2**  Algumas doenças genéticas humanas que afetam o catabolismo dos aminoácidos

| Condição médica | Incidência aproximada (por 100.000 nascimentos) | Processo defeituoso | Enzima defeituosa | Sintomas e efeitos |
|---|---|---|---|---|
| Acidemia argininossuccínica | < 1,5 | Síntese de ureia | Arginino-succinase | Vômitos; convulsões |
| Acidemia metilmalônica | < 0,5 | Conversão de propionil-CoA em succinil-CoA | Metilmalonil-CoA-mutase | Vômitos; convulsões; deficiência intelectual; morte prematura |
| Albinismo | < 3 | Síntese de melanina a partir de tirosina | Tirosina-3-monoxigenase (tirosinase) | Falta de pigmentação; cabelo branco, pele rosada |
| Alcaptonúria | < 0,4 | Degradação da tirosina | Homogentisato-1,2-dioxigenase | Pigmento escuro na urina; artrite se desenvolve posteriormente |
| Argininemia | < 0,5 | Síntese de ureia | Arginase | Deficiência intelectual |
| Deficiência de carbamoil-fosfato-sintetase I | < 0,5 | Síntese de ureia | Carbamoil-fosfato-sintetase I | Letargia; convulsões; morte prematura |
| Doença do xarope de bordo (cetoacidúria de cadeia ramificada) | < 0,4 | Degradação de isoleucina, leucina e valina | Complexo da desidrogenase dos $\alpha$-cetoácidos de cadeia ramificada | Vômitos; convulsões; retardo mental; morte prematura |
| Fenilcetonúria | < 8 | Conversão de fenilalanina em tirosina | Fenilalanina-hidroxilase | Vômitos no período neonatal; deficiência intelectual |
| Homocistinúria | < 0,5 | Degradação da metionina | Cistationina-$\beta$-sintase | Desenvolvimento inadequado dos ossos; deficiência intelectual |

seus carbonos) produzirão acetil-CoA, via acetoacetil-CoA. Alguns intermediários no catabolismo do triptofano são precursores para a síntese de outras biomoléculas (**Figura 18-22**), incluindo o nicotinato (um precursor do $NAD^+$ e do $NADP^+$ nos animais), a serotonina (um neurotransmissor em vertebrados), e o indolacetato (um fator de crescimento em plantas). Algumas dessas vias biossintéticas estão descritas mais detalhadamente no Capítulo 22 (ver Figuras 22-30 e 22-31).

A degradação da fenilalanina é notável, pois defeitos genéticos nas enzimas dessa via levam a diversas doenças humanas herdadas (**Figura 18-23**), conforme discutido a seguir. A fenilalanina e a tirosina, produto de sua oxidação (ambas com nove carbonos), são degradadas em dois fragmentos, ambos podendo entrar no ciclo do ácido cítrico: quatro dos nove átomos de carbono produzem acetoacetato livre, o qual é convertido em acetoacetil-CoA e então em acetil-CoA, e um segundo fragmento de quatro carbonos é recuperado como fumarato. Dessa forma, oito dos nove carbonos desses aminoácidos entram no ciclo do ácido cítrico; o carbono restante é perdido como $CO_2$. A fenilalanina, após ser hidroxilada produzindo tirosina, também é precursora da dopamina, um neurotransmissor, e da noradrenalina e da adrenalina, hormônios secretados pela medula suprarrenal (ver Figura 22-31)*. A melanina, o pigmento escuro observado na pele e no cabelo, também é derivada da tirosina.

* N. de T. Estas catecolaminas também atuam como neurotransmissores.

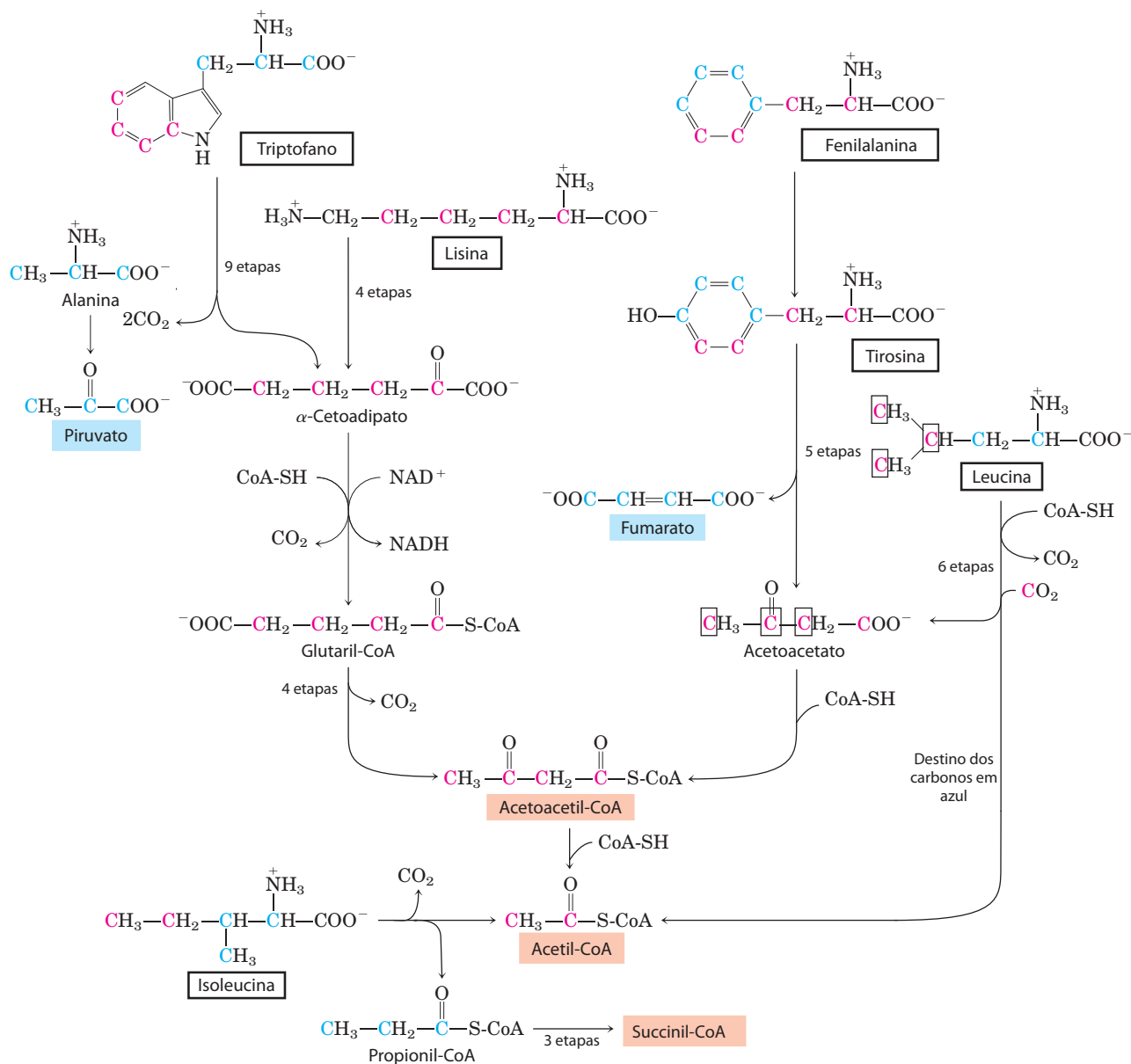



**FIGURA 18-21 Vias catabólicas para triptofano, lisina, fenilalanina, tirosina, leucina e isoleucina.** Esses aminoácidos doam alguns de seus carbonos (em cor salmão) para a acetil-CoA. O triptofano, a fenilalanina, a tirosina e a isoleucina também fornecem carbonos (em azul) para a produção de piruvato ou de intermediários do ciclo do ácido cítrico. A via da fenilalanina está descrita mais detalhadamente na Figura 18-23. O destino dos átomos de nitrogênio não é seguido neste esquema; na maior parte dos casos, eles são transferidos para o $\alpha$-cetoglutarato para formar glutamato.

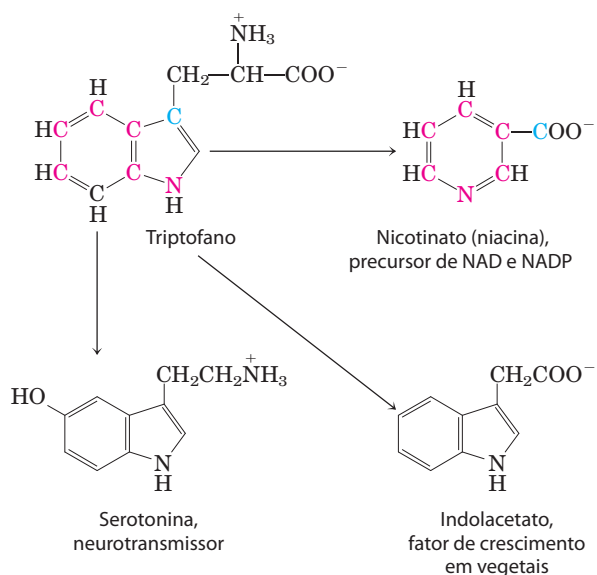



**FIGURA 18-22 O triptofano como precursor.** Os anéis aromáticos do triptofano originam o nicotinato (niacina), o indolacetato e a serotonina. Os átomos coloridos indicam a origem dos átomos do anel do nicotinato.

## O catabolismo da fenilalanina é defeituoso geneticamente em algumas pessoas

Considerando que muitos aminoácidos são neurotransmissores, ou precursores de neurotransmissores, ou antagonistas deles, não é de surpreender que defeitos genéticos no metabolismo dos aminoácidos possam causar prejuízo no desenvolvimento neural e deficiência intelectual. Em muitas dessas doenças, intermediários específicos se acumulam. Por exemplo, um defeito genético na **fenilalanina-hidroxilase**, a primeira enzima na via catabólica da fenilalanina (Figura 18-23), é responsável pela doença **fenilcetonúria** (**PKU**, de *phenylketonuria*), a causa mais comum de níveis elevados de fenilalanina no sangue (hiperfenilalaninemia).

A fenilalanina-hidroxilase (também denominada fenilalanina-4-monoxigenase) é uma enzima de uma classe geral de enzimas denominadas **oxidases de função mista** (ver Quadro 21-1), que catalisam simultaneamente a hidroxilação de um substrato por um átomo de oxigênio do $O_2$ e a redução do outro átomo de oxigênio em $H_2O$. A fenilalanina-hidroxilase requer o cofator tetra-hidrobiopterina, que transfere elétrons do NADPH ao oxigênio, oxidando-se a di-

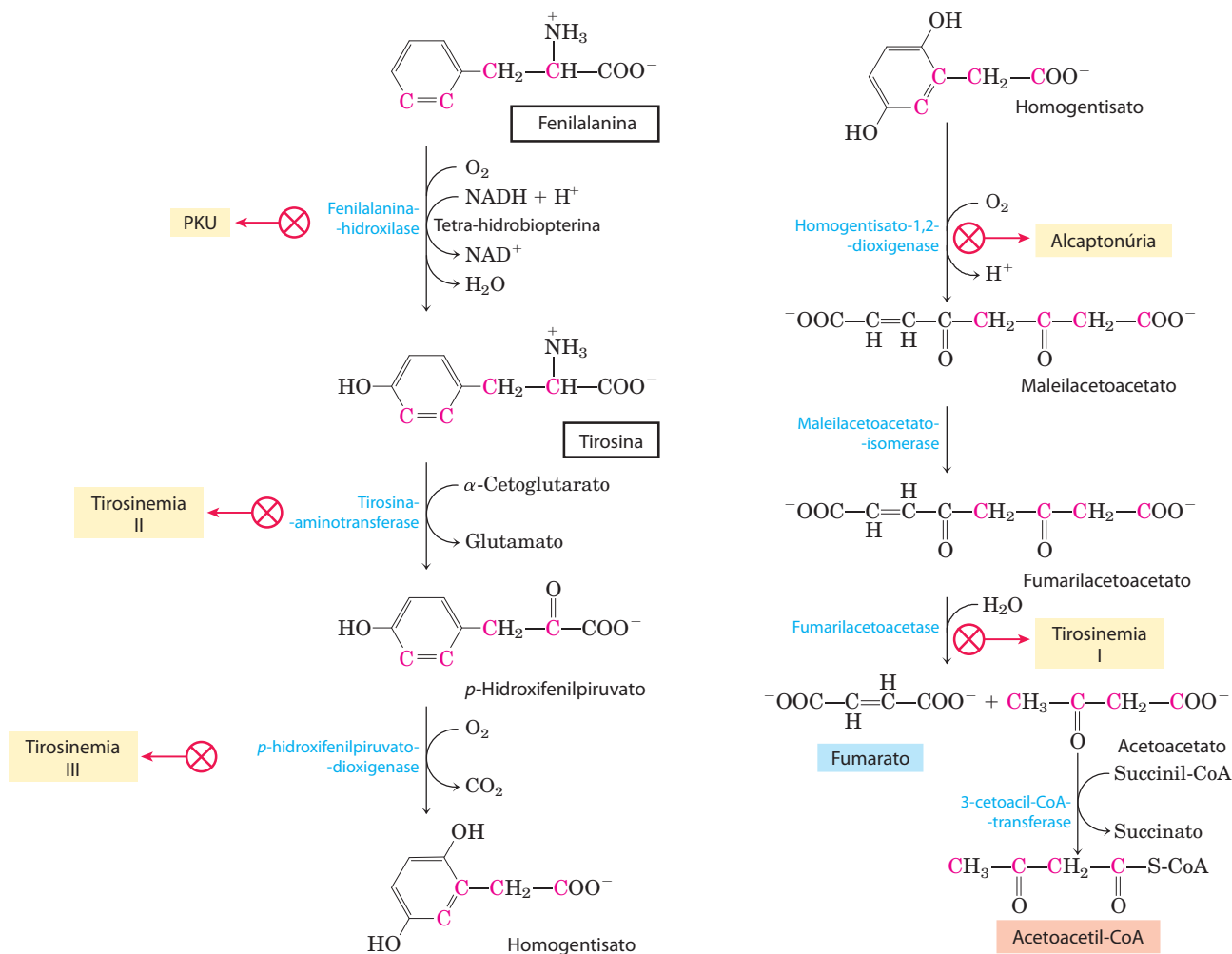



**FIGURA 18-23 Vias catabólicas para a fenilalanina e a tirosina.** Nos seres humanos, esses aminoácidos normalmente são convertidos em acetoacetil-CoA e fumarato. Defeitos genéticos em muitas dessas enzimas causam doenças humanas herdadas (sombreados em amarelo).

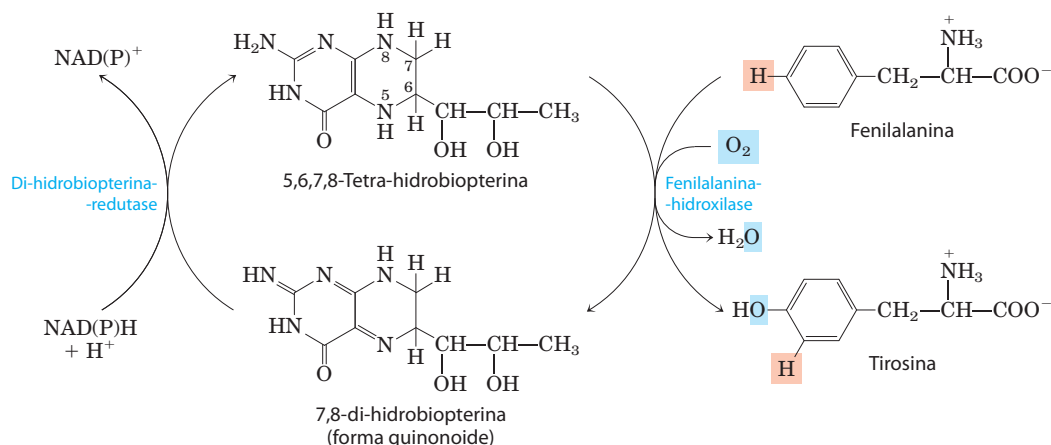



**FIGURA 18-24 O papel da tetra-hidrobiopterina na reação da fenilalanina-hidroxilase.** O átomo de H sombreado em cor-de-rosa é transferido diretamente do C-4 para o C-3 na reação. Essa característica, descoberta no National Institute of Health (NIH), é denominada "troca NIH".

-hidrobiopterina no processo (**Figura 18-24**). Em seguida, esse cofator é reduzido pela enzima **di-hidrobiopterina--redutase**, em uma reação que requer NADPH.

Em pessoas com PKU, uma rota secundária do metabolismo da fenilalanina, normalmente pouco utilizada, passa a desempenhar um papel mais proeminente. Nessa rota, a fenilalanina sofre transaminação com o piruvato, produzindo **fenilpiruvato** (**Figura 18-25**). A fenilalanina e o fenilpiruvato acumulam-se no sangue e nos tecidos e são excretados na urina – daí o nome "fenilcetonúria". Uma quantidade considerável de fenilpiruvato não é excretada como tal, mas sofre descarboxilação a fenilacetato ou redução a fenil-lactato. O fenilacetato confere à urina um odor característico, tradicionalmente utilizado por enfermeiros para detectar PKU em bebês. O acúmulo de fenilalanina ou de seus metabólitos no início da vida prejudica o desenvolvimento normal do cérebro, causando grave deficiência intelectual. Isso pode ser causado pelo excesso de fenilalanina, que compete com outros aminoácidos pelo transporte através da barreira hematoencefálica, resultando em déficit de metabólitos necessários.

A fenilcetonúria está entre os primeiros defeitos metabólicos herdados do metabolismo descobertos em humanos. Quando essa condição é identificada nos primeiros dias de vida, a deficiência intelectual pode ser prevenida pelo controle rígido da dieta, a qual deve suprir fenilalanina apenas suficiente para atender às necessidades de síntese proteica. O consumo de alimentos ricos em proteínas deve ser reduzido. Proteínas naturais, como a caseína do leite, devem ser primeiramente hidrolisadas e boa parte da fenilalanina deve ser removida para que o paciente receba uma dieta adequada, pelo menos durante toda a sua infância. Uma vez que o adoçante artificial aspartame é um dipeptídeo contendo aspartato e um metil-éster da fenilalanina (ver Figura 1-24b), alimentos adoçados com aspartame contêm avisos dirigidos a pessoas recebendo dietas em que o conteúdo de fenilalanina deve ser controlado.

A fenilcetonúria também pode ser causada por um defeito na enzima que catalisa a regeneração da tetra-hidrobiopterina (Figura 18-24). O tratamento, nesse caso, é mais complexo do que a restrição da ingestão de fenilalanina. A tetra-hidrobiopterina também é necessária para a formação de L-3,4-di-hidroxifenilalanina (L-dopa), precursor dos neurotransmissores dopamina e noradrenalina, e de 5-hidroxitriptofano, precursor do neurotransmissor serotonina. Na fenilcetonúria desse tipo, esses precursores devem ser supridos na dieta. A suplementação da dieta com a própria tetra-hidrobiopterina é ineficiente, pois ela é instável e não cruza a barreira hematoencefálica.

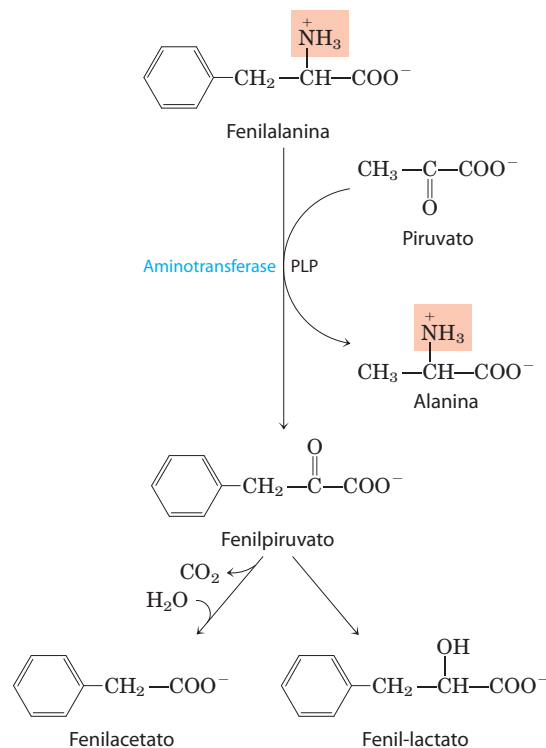
A triagem de doenças genéticas em recém-nascidos pode apresentar uma relação custo-benefício bastante favorável,



**FIGURA 18-25 Rotas alternativas para o catabolismo da fenilalanina na fenilcetonúria.** Na PKU, o fenilpiruvato se acumula nos tecidos, no sangue e na urina. A urina pode ainda conter fenilacetato e fenil-lactato.

especialmente no caso da PKU. Os testes (que não mais se baseiam no odor da urina) são relativamente baratos e a detecção seguida pelo tratamento precoce da PKU em bebês (oito a dez casos a cada 100.000 nascidos vivos) economiza, em posterior assistência à saúde, milhões de dólares por ano. Mais importante, evitar o trauma emocional pela detecção com esses testes simples é inestimável.*

Outra doença hereditária do catabolismo da fenilalanina é a **alcaptonúria**, na qual a enzima defeituosa é a **homogentisato-dioxigenase** (Figura 18-23). Menos grave que a PKU, essa condição produz poucos efeitos adversos, embora grandes quantidades de homogentisato sejam excretadas e sua oxidação torne a urina escura. Pessoas com alcaptonúria também são mais suscetíveis ao desenvolvimento de uma forma de artrite. A alcaptonúria é de considerável interesse histórico. Archibald Garrod descobriu, no início do século XX, que essa condição é herdada e investigou a causa até chegar à ausência de uma única enzima. Garrod foi o primeiro a estabelecer uma conexão entre um traço herdado e uma enzima – um grande avanço no caminho que, por fim, levaria à nossa atual compreensão dos genes e das vias de expressão da informação, descritas na Parte III. ■

* N. de T. No Brasil, esse teste de triagem para erros inatos do metabolismo é conhecido como "teste do pezinho".

## Cinco aminoácidos são convertidos em $\alpha$-cetoglutarato

Os esqueletos de carbono de cinco aminoácidos (prolina, glutamato, glutamina, arginina e histidina) entram no ciclo do ácido cítrico como $\alpha$-cetoglutarato (**Figura 18-26**). A **prolina**, o **glutamato** e a **glutamina** têm esqueletos de cinco carbonos. A estrutura cíclica da prolina é aberta pela oxidação do carbono mais distante do grupo carboxila, criando uma base de Schiff, seguindo-se a hidrólise da base de Schiff para produzir um semialdeído linear, o $\gamma$-semialdeído do glutamato. Esse intermediário é posteriormente oxidado no mesmo carbono, produzindo glutamato. A glutamina é convertida em glutamato na reação da glutaminase ou em qualquer outra en-

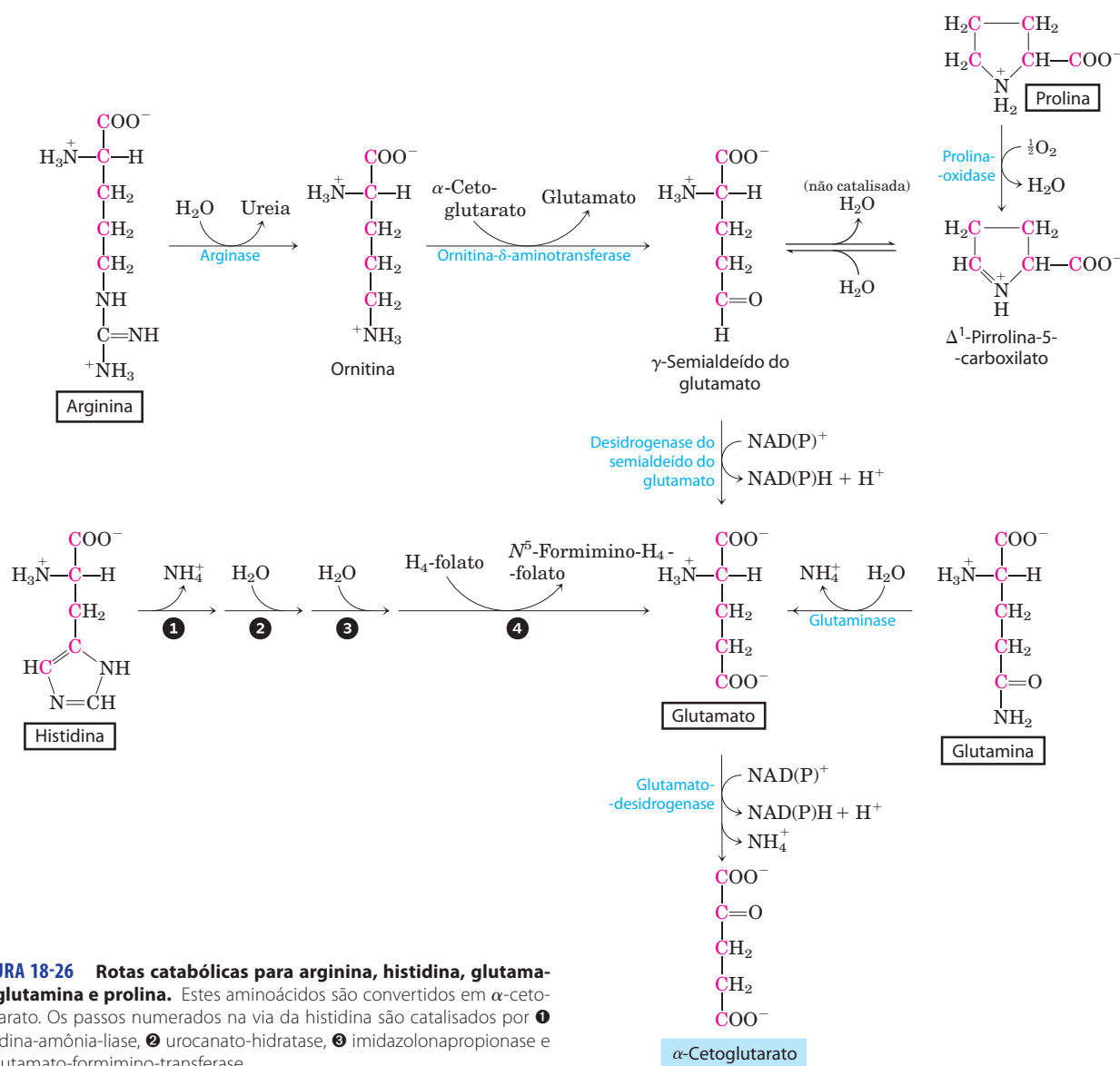



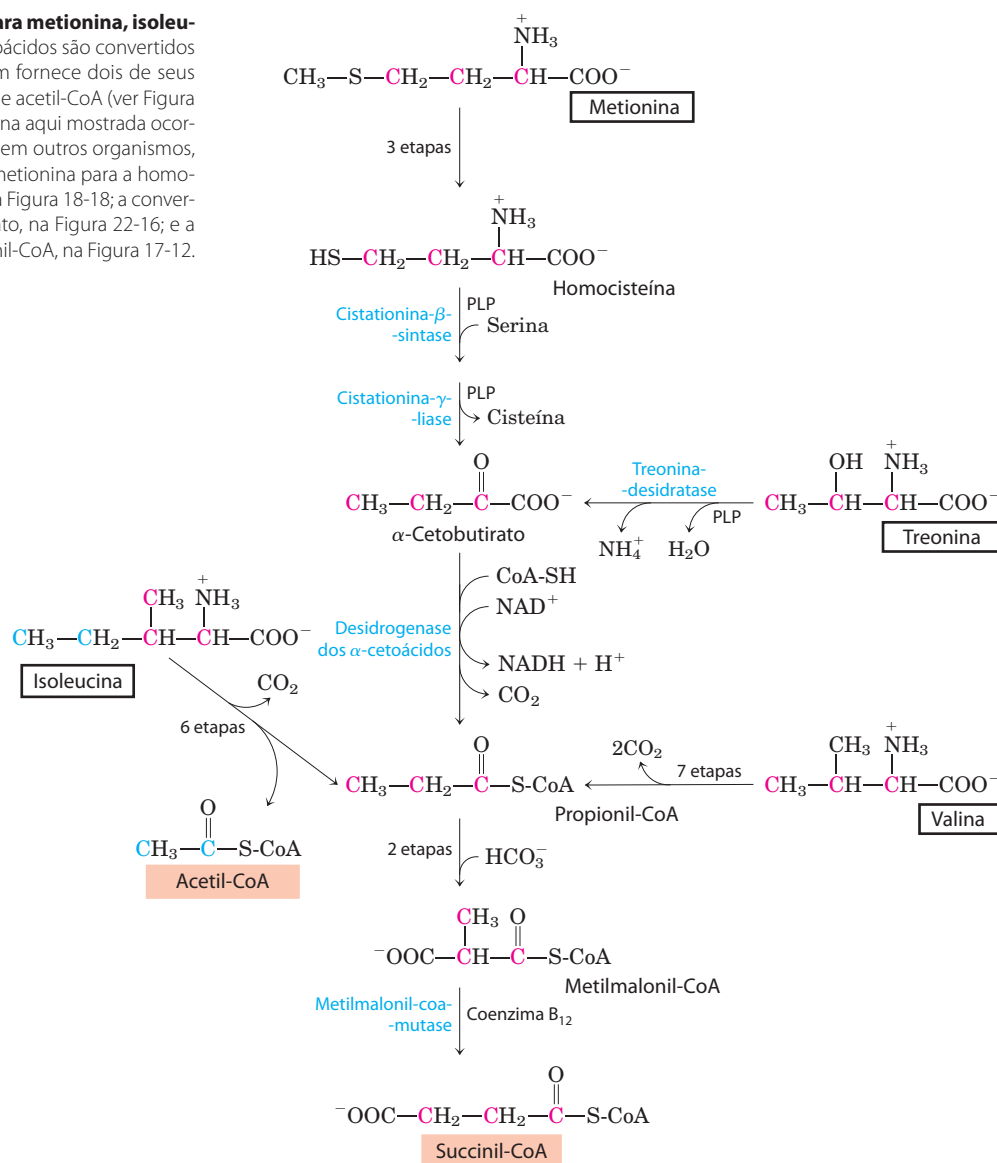
**FIGURA 18-26 Rotas catabólicas para arginina, histidina, glutamato, glutamina e prolina.** Estes aminoácidos são convertidos em $\alpha$-cetoglutarato. Os passos numerados na via da histidina são catalisados por ❶ histidina-amônia-liase, ❷ urocanato-hidratase, ❸ imidazolonapropionase e ❹ glutamato-formimino-transferase.

tre as diversas reações enzimáticas em que a glutamina doa seu nitrogênio amídico a um aceptor. A transaminação ou a desaminação do glutamato produz $\alpha$-cetoglutarato.

A **arginina** e a **histidina** contêm cinco carbonos adjacentes e um sexto carbono ligado por meio de um átomo de nitrogênio. Assim sendo, a conversão catabólica desses aminoácidos em glutamato é um pouco mais complexa que a rota da prolina ou da glutamina (Figura 18-26). A arginina é convertida no esqueleto de cinco carbonos da ornitina, no ciclo da ureia (Figura 18-10), e a ornitina sofre transaminação, produzindo o $\gamma$-semialdeído do glutamato. A conversão da histidina em glutamato, de cinco carbonos, ocorre em uma rota de múltiplas etapas; o carbono extra é removido em uma etapa que utiliza tetra-hidrofolato como cofator.

## Quatro aminoácidos são convertidos em succinil-CoA

Os esqueletos de carbono da metionina, da isoleucina, da treonina e da valina são degradados por rotas que produzem succinil-CoA (**Figura 18-27**), um intermediário do ciclo do ácido cítrico. A **metionina** doa seu grupo metila a um de diversos aceptores possíveis, via *S*-adenosilmetionina, e três de seus quatro átomos de carbono remanescentes são convertidos no propionato da propionil-CoA, um precursor da succinil-CoA. A **isoleucina** sofre transaminação, seguinda pela a descarboxilação oxidativa do $\alpha$-cetoácido resultante. O esqueleto restante, de cinco carbonos, é ainda mais oxidado, produzindo acetil-CoA e propionil-CoA. A **valina** sofre transaminação e descarboxilação, seguindo-se uma série de reações de oxidação que convertem os quatro carbonos restantes em propionil-CoA. Algumas partes das rotas de degradação da valina e da isoleucina apresentam um paralelo muito próximo a etapas da degradação de ácidos graxos (ver Figura 17-9). Em tecidos humanos, a **treonina** também é convertida, por meio de duas etapas, em propionil-CoA. Essa é a principal rota de degradação da treonina em humanos (ver na Figura 18-19 a via alternativa). O mecanismo para a primeira etapa é análogo àquele da reação catalisada

**FIGURA 18-27 Rotas catabólicas para metionina, isoleucina, treonina e valina.** Esses aminoácidos são convertidos em succinil-CoA; a isoleucina também fornece dois de seus átomos de carbono para a produção de acetil-CoA (ver Figura 18-21). A rota da degradação da treonina aqui mostrada ocorre nos humanos; outra via, observada em outros organismos, é mostrada na Figura 18-19. A via da metionina para a homocisteína é descrita em maior detalhe na Figura 18-18; a conversão de homocisteína em $\alpha$-cetobutirato, na Figura 22-16; e a conversão de propionil-CoA em succinil-CoA, na Figura 17-12.

pela serina-desidratase, sendo possível que as desidratases da serina e da treonina sejam, de fato, a mesma enzima.

A propionil-CoA derivada desses três aminoácidos é convertida em succinil-CoA por meio de uma via descrita no Capítulo 17: carboxilação, produzindo metilmalonil-CoA, epimerização da metilmalonil-CoA e conversão em succinil-CoA pela metilmalonil-CoA-mutase, dependente da coenzima $B_{12}$ (ver Figura 17-12). Na rara doença genética conhecida como acidemia metilmalônica, a metilmalonil-CoA-mutase está deficiente, com graves consequências metabólicas (Tabela 18-2; Quadro 18-2).

## Os aminoácidos de cadeia ramificada não são degradados no fígado

Embora boa parte do catabolismo dos aminoácidos aconteça no fígado, os três aminoácidos com cadeias laterais ramificadas (leucina, isoleucina e valina) são oxidados como combustível principalmente pelos tecidos muscular, adiposo, renal e cerebral. Esses tecidos extra-hepáticos contêm uma aminotransferase, ausente no fígado, que atua sobre os três aminoácidos de cadeia ramificada, produzindo os $\alpha$-cetoácidos correspondentes (**Figura 18-28**). O **complexo da desidrogenase dos $\alpha$-cetoácidos de cadeia ramificada** catalisa então a descarboxilação oxidativa dos três $\alpha$-cetoácidos, liberando o grupo carboxila como $CO_2$ e produzindo o derivado acil-CoA respectivo. Quanto à forma, essa descarboxilação é análoga a duas outras descarboxilações oxidativas que são encontradas no Capítulo 16: a oxidação do piruvato em acetil-CoA pelo complexo da piruvato-desidrogenase (ver Figura 16-6) e a oxidação do $\alpha$-cetoglutarato em succinil-CoA pelo complexo da $\alpha$-cetoglutarato-desidrogenase (p. 644). De fato, esses três complexos enzimáticos são estruturalmente semelhantes e compartilham essencialmente o mesmo mecanismo de reação. Cinco cofatores (a tiamina-pirofosfato, o FAD, o NAD, o lipoato e a coenzima A) participam, e as três proteínas em cada complexo catalisam reações homólogas. Esse caso representa claramente uma situação em que a maquinaria enzimática que evoluiu para catalisar uma reação foi "emprestada" por duplicação gênica, evoluindo adicionalmente para catalisar reações semelhantes em outras vias.

Experimentos com ratos têm mostrado que o complexo da desidrogenase dos $\alpha$-cetoácidos de cadeia ramificada é regulado por modificação covalente em resposta ao conteúdo de aminoácidos de cadeia ramificada na dieta. Quando houver pouco ou nenhum excesso desses aminoácidos na dieta, o complexo enzimático é fosforilado por uma proteína-cinase e, dessa forma, inativado. A adição à dieta de excesso de aminoácidos de cadeia ramificada resulta na desfosforilação e consequente ativação da enzima. Lembre que o complexo da piruvato-desidrogenase está sujeito a uma regulação semelhante por fosforilação e desfosforilação (p. 654).

Existe uma doença genética relativamente rara em que os três $\alpha$-cetoácidos de cadeia ramificada (assim como seus aminoácidos precursores, especialmente a leucina) acumulam-se no sangue, "extravasando" para a urina. Essa condição, denominada **doença do xarope de bordo** devido ao odor característico conferido à urina pelos $\alpha$-ce-

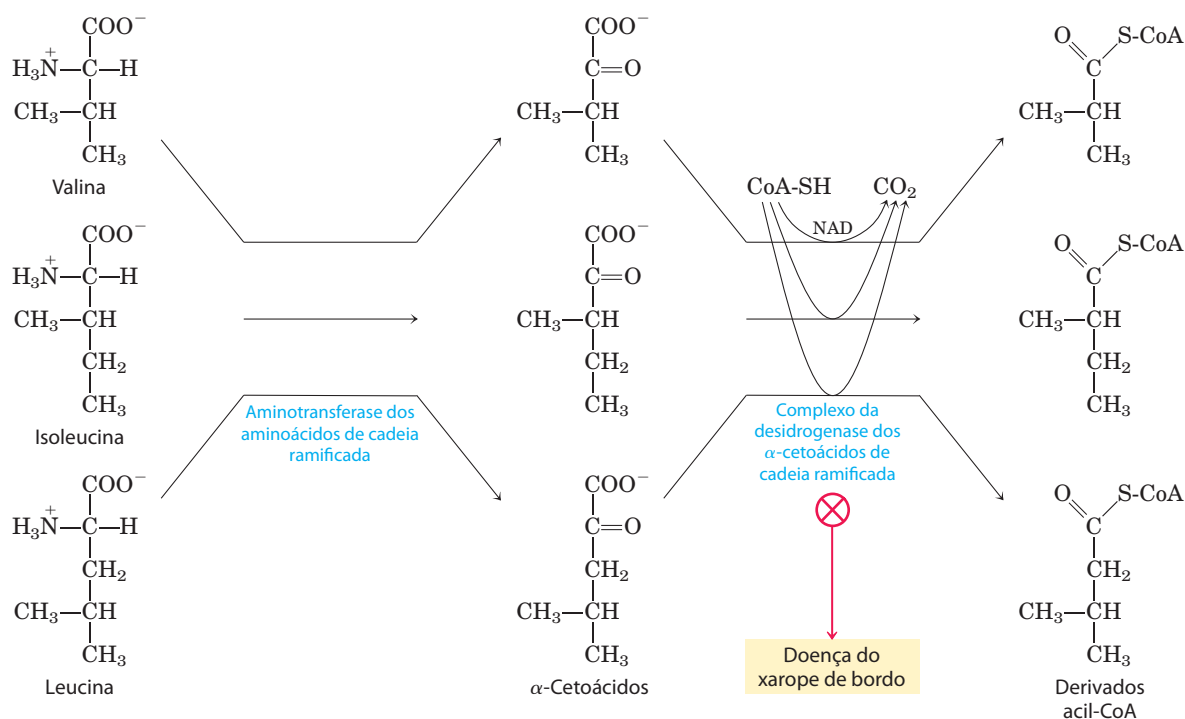



**FIGURA 18-28 Rotas catabólicas para os três aminoácidos de cadeia ramificada: a valina, a isoleucina e a leucina.** As três vias ocorrem em tecidos extra-hepáticos e compartilham as duas primeiras enzimas, conforme mostrado nesta figura. O complexo da desidrogenase dos $\alpha$-cetoácidos de cadeia ramificada é análogo aos complexos da piruvato-desidrogenase e da $\alpha$-cetoglutarato-desidrogenase e requer os mesmos cinco cofatores (alguns não são mostrados aqui). Essa enzima está deficiente em pacientes com a doença do xarope de bordo.

**QUADRO 18-2**  **MEDICINA** **Detetives científicos solucionam um assassinato misterioso**

Às vezes, a verdade pode ser mais estranha que a ficção – ou, pelo menos, tão estranha quanto um filme. Observe, por exemplo, o caso de Patricia Stallings. Condenada pela morte de seu bebê, ela foi sentenciada à prisão perpétua – mas foi posteriormente inocentada, graças à investigação médica de três persistentes pesquisadores.

A história começou no verão de 1989, quando Stallings levou Ryan, seu filho de três meses de idade, à emergência do Cardinal Glennon Children's Hospital, em St. Louis. O garoto apresentava respiração difícil, vômitos incontroláveis e disfunções gástricas. De acordo com o médico que o atendeu, um toxicologista, os sintomas do bebê indicavam envenenamento por etilenoglicol, um ingrediente de anticongelantes, conclusão aparentemente confirmada pela análise em um laboratório comercial.

Após sua recuperação, o menino foi colocado em um lar adotivo, e Stallings e seu marido, David, podiam vê-lo apenas em visitas supervisionadas. No entanto, quando o bebê ficou doente e morreu após uma visita em que Stallings ficou sozinha com ele, ela foi acusada de assassinato em primeiro grau, sendo declarada prisão inafiançável. Na ocasião, as evidências pareciam contundentes, pois os dois laboratórios, o comercial e o do hospital, haviam encontrado grandes quantidades de etilenoglicol no sangue do menino e traços desse produto em uma mamadeira que Stallings havia utilizado para alimentá-lo durante sua visita.

Contudo, sem sabê-lo, Stallings havia realizado um experimento brilhante. Enquanto estava presa, descobriu que estava grávida; um tempo depois, ela deu à luz outro filho, David Stallings Jr., em fevereiro de 1990. Ele foi colocado imediatamente em um lar adotivo, mas após duas semanas começou a apresentar sintomas semelhantes aos de Ryan. David foi por fim diagnosticado com uma rara doença metabólica denominada acidemia metilmalônica (MMA, de *methylmalonic acidemia*). Essa doença, distúrbio genético recessivo do metabolismo dos aminoácidos, afeta cerca de 1 em 48.000 recém-nascidos e apresenta sintomas quase idênticos àqueles causados por envenenamento por etilenoglicol.

Stallings não poderia ter envenenado seu segundo filho, mas a procuradoria do Estado do Missouri não ficou impressionada com esse novo fato e prosseguiu com o julgamento. A corte não permitiu que o diagnóstico de MMA do segundo filho fosse apresentado como evidência e, em janeiro de 1991, Patricia Stallings foi condenada por agressão com arma letal e sentenciada à prisão perpétua.

Felizmente para Stallings, no entanto, William Sly, professor do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade de St. Louis, e James Shoemaker, chefe de um laboratório de triagem metabólica da Universidade, interessaram-se por esse caso quando souberam dele em uma reportagem de televisão. Shoemaker realizou suas próprias análises do sangue de Ryan e não detectou etilenoglicol. Ele e Sly então contactaram Piero Rinaldo, especialista em doenças metabólicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Yale, cujo laboratório estava equipado para diagnosticar MMA a partir de amostras de sangue.

Quando Rinaldo analisou o soro sanguíneo de Ryan, encontrou altas concentrações de ácido metilmalônico, produto da degradação dos aminoácidos de cadeia ramificada isoleucina e valina, que se acumula em pacientes com MMA, pois a enzima que devia convertê-lo no próximo produto da via metabólica está defeituosa (Figura Q-1). E, fato especialmente expressivo: o sangue e a urina da criança continham quantidades enormes de cetonas, outra consequência metabólica da doença. Assim como

toácidos, resulta de uma deficiência no complexo da desidrogenase dos $\alpha$-cetoácidos de cadeia ramificada. Quando não tratada, a doença resulta em desenvolvimento anormal do cérebro, deficiência intelectual e morte no início da infância. O tratamento inclui controle rígido da dieta, com limitação da ingestão de valina, isoleucina e leucina ao mínimo necessário para permitir um crescimento normal. ■

## A asparagina e o aspartato são degradados em oxaloacetato

Os esqueletos de carbono da **asparagina** e do **aspartato** entram, por fim, no ciclo do ácido cítrico como malato nos mamíferos ou como oxaloacetato nas bactérias. A enzima **asparaginase** catalisa a hidrólise da asparagina, produzindo aspartato, o qual sofre transaminação com o $\alpha$-cetoglutarato, gerando glutamato e oxaloacetato (**Figura 18-29**). O oxaloacetato é convertido em malato no citosol e, então, transportado para a matriz mitocondrial pelo transportador malato-$\alpha$-cetoglutarato. Em bactérias, o oxaloacetato produzido na reação de transaminação pode ser utilizado diretamente no ciclo do ácido cítrico.

Asparagina
Asparaginase: $H_2O$ → $NH_4^+$
Aspartato
Aspartato-aminotransferase (PLP): $\alpha$-Cetoglutarato → Glutamato
Oxaloacetato

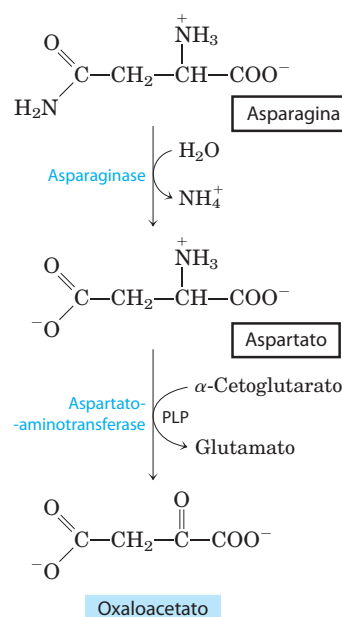



**FIGURA 18-29 Rotas catabólicas para asparagina e aspartato.** Ambos os aminoácidos são convertidos em oxaloacetato.

Isoleucina
Metionina
Treonina
Valina
$CH_3CH_2C(=O)S\text{-}CoA$
Propionil-CoA
$^{-}OOC-CH(CH_3)-C(=O)S\text{-}CoA$
Metil-malonil-CoA
$^{-}OOC-CH_2-CH_2-C(=O)S\text{-}CoA$
Succinil-CoA
$^{-}OOC-CH(CH_3)-C(=O)O^{-}$
O ácido metilmalônico acumula-se em tecidos, no sangue e na urina

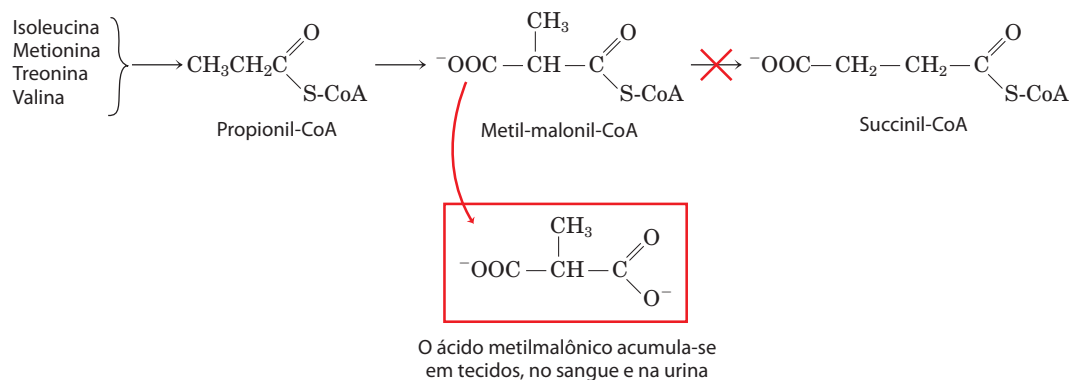



**FIGURA Q-1** Crianças com uma mutação (X em vermelho) que inativa a enzima metilmalonil-CoA mutase não degradam normalmente os aminoácidos isoleucina, metionina, treonina e valina. Ocorre um acúmulo potencialmente fatal de ácido metilmalônico, com sintomas semelhantes aos do envenenamento por etilenoglicol.

Shoemaker, ele não encontrou nenhum etilenoglicol em uma amostra dos fluidos corporais do bebê. A mamadeira não pode ser testada, uma vez que havia desaparecido misteriosamente. A análise de Rinaldo o convenceu de que Ryan havia morrido em consequência de MMA, mas como explicar os resultados de dois laboratórios que indicavam que o menino apresentava etilenoglicol em seu sangue? Será que os dois poderiam estar errados?

Quando Rinaldo obteve os dois relatos dos laboratórios, o que viu, afirma ele, "foi assustador". Um dos laboratórios havia concluído que o sangue de Ryan Stallings continha etilenoglicol, mesmo que a análise da amostra de sangue não apresentasse o perfil do próprio laboratório para uma amostra-padrão contendo etilenoglicol. "Não era apenas um problema de interpretação questionável. A qualidade da análise era inaceitável", observa Rinaldo. E o segundo laboratório? De acordo com Rinaldo, o laboratório detectou um componente anormal no sangue de Ryan e apenas "presumiu que fosse etilenoglicol". As amostras da mamadeira não mostraram nada fora do comum, diz Rinaldo, e ainda assim o laboratório também declarou haver nela evidências de etilenoglicol.

Rinaldo apresentou seus achados ao procurador do caso, George McElroy, que convocou uma coletiva de imprensa no dia seguinte. "Não acredito mais nos dados dos laboratórios", ele disse aos jornalistas. Tendo concluído que, ao fim das contas, Ryan Stallings havia morrido de MMA, McElroy retirou todas as acusações contra Patricia Stallings em 20 de setembro de 1991.

*Por Michelle Hoffman (1991). *Science* **253**, 931. Direitos autorais da American Association for the Advancement of Science.

Até este ponto, foi estudado como os 20 aminoácidos proteicos, após perderem seus átomos de nitrogênio, são degradados por desidrogenação, descarboxilação e por outras reações em que porções de seus esqueletos de carbono alcançam a forma de seis metabólitos centrais que podem entrar no ciclo do ácido cítrico. Aquelas porções degradadas até acetil-CoA são completamente oxidadas até dióxido de carbono e água, com produção de ATP pela fosforilação oxidativa.

Da mesma forma que ocorre com carboidratos e lipídeos, a degradação dos aminoácidos resulta, ao final, na produção de equivalentes redutores (NADH e $FADH_2$) pela ação do ciclo do ácido cítrico. O estudo dos processos catabólicos será concluído no próximo capítulo com uma discussão sobre a respiração, em que os equivalentes redutores alimentam o processo fundamental de oxidação e geração de energia nos organismos aeróbios.

## RESUMO 18.3 Rotas de degradação dos aminoácidos

- Após a remoção dos grupos amino, os esqueletos de carbono dos aminoácidos sofrem oxidação a compostos capazes de entrar no ciclo do ácido cítrico para oxidação a $CO_2$ e $H_2O$. As reações dessas rotas necessitam de diversos cofatores, incluindo o tetra-hidrofolato e a *S*-adenosilmetionina, em reações de transferência de um carbono, e a tetra-hidrobiopterina na oxidação da fenilalanina pela fenilalanina-hidroxilase.
- Dependendo de seu produto final de degradação, alguns aminoácidos podem ser convertidos em corpos cetônicos, alguns em glicose e alguns em ambos. Assim, a degradação dos aminoácidos está integrada ao metabolismo intermediário, podendo ser crucial para a sobrevivência em condições nas quais os aminoácidos são uma fonte significativa de energia metabólica.
- Os esqueletos de carbono dos aminoácidos entram no ciclo do ácido cítrico por meio de cinco intermediários: acetil-CoA, $\alpha$-cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato e oxaloacetato. Alguns são degradados em piruvato, que pode ser convertido em acetil-CoA ou em oxaloacetato.
- Os aminoácidos que produzem piruvato são a alanina, a cisteína, a glicina, a serina, a treonina e o triptofano. A leucina, a lisina, a fenilalanina e o triptofano produzem acetil-CoA, via acetoacetil-CoA. A isoleucina, a leucina, a treonina e o triptofano também produzem acetil-CoA diretamente.

- A arginina, o glutamato, a glutamina, a histidina e a prolina produzem $\alpha$-cetoglutarato; a isoleucina, a metionina, a treonina e a valina produzem succinil-CoA; quatro átomos de carbono da fenilalanina e da tirosina levam à produção de fumarato; a asparagina e o aspartato produzem oxaloacetato.
- Os aminoácidos de cadeia ramificada (isoleucina, leucina e valina), diferentemente dos demais aminoácidos, são degradados apenas em tecidos extra-hepáticos.
- Diversas doenças humanas graves são causadas por defeitos genéticos nas enzimas do catabolismo dos aminoácidos.

## Termos-chave

*Os termos em negrito estão definidos no glossário.*



## Leituras adicionais

### Gerais

**Amon, J., Titgemeyer, F. & Burkovski, A.** (2010). Common patterns – unique features: nitrogen metabolism and regulation in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev*, **34**, 588-605.

**Arias, I.M., Alter, H.J., Boyer, J.L., Cohen, D.E., Fausto, N., Shafritz, D.A. & Wolkof, A.W.** (2009). *The liver: Biology and pathobiology*, 5th ed., John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.

**Brosnan, J.T.** (2001). Amino acids, then and now – a reflection on Sir Hans Krebs' contribution to nitrogen metabolism. *IUBMB Life* **52**, 265-270.

Interessante excursão pela vida desse importante bioquímico.

**Frey, P.A. & Hegeman, A.D.** (2006). *Enzymatic reaction Mechanisms*, Oxford University Press, New York.

Boa fonte para uma discussão aprofundada das classes de mecanismos de reações enzimáticas descritos neste capítulo.

### Metabolismo dos aminoácidos

**Christen, P. & Metzler, D.E.** (1985). *Transaminases*, Wiley-Interscience, Inc., New York.

**Curthoys, N.P. & Watford, M.** (1995) Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu. Rev. Nutr*. **15**, 133-159.

**Eliot, A.C. & Kirsch, J.F.** (2004) Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural and evolutionary considerations. *Annu. Rev. Biochem*. **73**, 383-415.

**Fitzpatrick, P.F.** (1999). Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu. Rev. Biochem*. **68**, 355-382.

**Kalhan, S.C. & Bier, D.M.** (2008) Protein and amino acid metabolism in the human newborn. *Annu. Rev. Nutr*. **28**, 389-410.

**Pencharz, P.B. & Ball, R.O.** (2003) Different approaches to define individual amino acids requirements. *Annu. Rev. Nutr*. **23**, 101-116.

Como relata esta revisão, a determinação de quais aminoácidos são essenciais na dieta humana não é um problema trivial.

### O ciclo da ureia

**Braissant, O.** (2010) Current concepts in the pathogenesis of urea cycle disorders. *Mol. Genet. Metab*. **100,** S3-S12.

**Brusilow, S.W. & Horwich, A.L.** (2006) Urea cycle enzymes. In *Scriver's Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Valle, D, Beaudet, A.L., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., Antonarakis, S.E., Ballabio, A., eds.), http://dx.doi.org/10.1036/ommbid, 108.

Fonte competente a respeito desta rota.

**Enns, G.M., Berry, S.A., Berry, G.T., Rhead, W.J., Brusilow, S.W. & Hamosh, A.** (2007) Survival after treatment with phenylacetate and benzoate for urea-cycle disorders. *N. Engl. J. Med.* **356,** 2282-2292.

**Kresge, N., Simoni, R.D. & Hill, R.L.** (2005) Four decades of research on the biosynthesis of urea: the work of Sarah Ratner. *J. Biol. Chem*. **280**, e34.

**Morris S.M.** (2002). Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu. Rev. Nutr*. **22**, 87-105.

Esta revisão detalha o que se conhece sobre alguns níveis de regulação não estudados neste capítulo, como regulação hormonal e nutricional.

**Simoni, R.D., Hill, R.L., Vaughan, M. & Tabor, H.** (2004) Transaminases: the work of Philip P. Cohen. *J. Biol. Chem.* 279, e1.

### Distúrbios da degradação dos aminoácidos

**Ledley, F.D., Levy, H.L. & Woo, S.L.C.** (1986). Molecular analysis of the inheritance of phenylketonuria and mild hyperphenylalaninemia in families with both disorders. *N. Engl. J. Med*. **314**, 1276-1280.

**Scriver, C.R., Kaufman, S. & Woo, S.L.C.** (1988) Mendelian hyperphenylalaninemia. *Annu. Rev. Genet*. **22**, 301-321.

**Valle, D., Beaudet, A.L., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., Antonarakis, S.E. & Ballabio, A.** (eds) (2006, atualizada em 2011). *Scriver's Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Parte 8: Amino Acids; www.ommbid.com.

**Werner, E.R., Blau, N & Thöny, B.** (2011) Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. *Biochem, J*. **438**, 397-414.

## Problemas

**1. Produtos da transaminação dos aminoácidos.** Nomeie e desenhe a estrutura dos $\alpha$-cetoácidos que resultam quando cada um dos seguintes aminoácidos sofre transaminação com o $\alpha$-cetoglutarato: (a) aspartato, (b) glutamato, (c) alanina, (d) fenilalanina.

**2. Avaliação da atividade da alanina-aminotransferase.** A atividade (velocidade da reação) da alanina-aminotransferase é medida, geralmente, incluindo ao sistema reacional um excesso de lactato-desidrogenase pura e de NADH. A velocidade de desaparecimento da alanina é igual à velocidade de desaparecimento do NADH, medida por espectrofotometria. Explique como funciona esse ensaio.

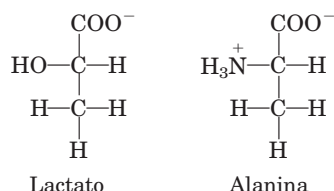
**3. A alanina e a glutamina no sangue.** O plasma sanguíneo humano normal contém todos os aminoácidos necessários para a

síntese das proteínas teciduais, mas não em iguais concentrações. A alanina e a glutamina estão presentes em concentrações muito mais elevadas que os demais aminoácidos. Sugira uma razão.

**4. Distribuição do nitrogênio amínico.** Se sua dieta é rica em alanina, mas deficiente em aspartato, você apresentará sinais de deficiência em aspartato? Explique.

**5. Lactato *versus* alanina como combustível metabólico: o custo da remoção do nitrogênio.** Os três carbonos do lactato e da alanina apresentam estados de oxidação idênticos, e os animais podem usar qualquer uma dessas fontes de carbono como combustível metabólico. Compare a produção líquida de ATP (mols de ATP por mol de substrato) para a oxidação completa (a $CO_2$ e $H_2O$) de lactato *versus* alanina quando o custo da excreção de nitrogênio como ureia é incluído.

$$\begin{array}{c} COO^- \\ | \\ HO-C-H \\ | \\ H-C-H \\ | \\ H \end{array} \qquad \begin{array}{c} COO^- \\ | \\ H_3\overset{+}{N}-C-H \\ | \\ H-C-H \\ | \\ H \end{array}$$

Lactato Alanina

**6. Toxicidade da amônia como resultado de uma dieta deficiente em arginina.** Em estudo realizado alguns anos atrás, gatos foram submetidos a um jejum durante a noite e então receberam uma única refeição, completa em relação a todos os aminoácidos, com exceção da arginina. Dentro de duas horas, os níveis de amônia no sangue aumentaram dos níveis normais de 18 $\mu$g/L para 140 $\mu$g/L, e os gatos mostraram sintomas clínicos de intoxicação por amônia. Um grupo controle recebeu uma dieta contendo todos os aminoácidos ou uma dieta em que a arginina era substituída pela ornitina e não mostrou qualquer sintoma clínico incomum.

(a) Qual a razão do jejum no experimento?

(b) Qual a causa do aumento dos níveis de amônia no grupo experimental? Por que a ausência de arginina levou à intoxicação pela amônia? A arginina é um aminoácido essencial para os gatos? Por quê? Ou por que não?

(c) Por que a ornitina pode substituir a arginina?

**7. Oxidação do glutamato.** Escreva uma série de equações balanceadas e uma equação geral para a reação global, descrevendo a oxidação de 2 mols de glutamato em 2 mols de $\alpha$-cetoglutarato e 1 mol de ureia.

**8. Transaminação e o ciclo da ureia.** A aspartato-aminotransferase apresenta a maior atividade, entre todas as aminotransferases do fígado de mamíferos. Por quê?

**9. O caso contra a dieta da proteína líquida.** Uma dieta para a redução do peso fortemente promovida alguns anos atrás propunha a ingestão diária de "proteína líquida" (sopa de gelatina hidrolisada), água e uma seleção de vitaminas. Os demais alimentos e bebidas deveriam ser evitados. Pessoas utilizando essa dieta perdiam, geralmente, 4 a 6 kg na primeira semana.

(a) Pessoas contrárias a essa dieta argumentavam que a perda de peso era quase que inteiramente devida à perda de água e que o peso perdido logo seria reposto, após a pessoa voltar a utilizar uma dieta normal. Qual a base bioquímica para esse argumento?

(b) Algumas pessoas morreram durante a utilização dessa dieta. Quais os riscos inerentes a essa dieta e como podem levar à morte?

**10. Aminoácidos cetogênicos.** Quais aminoácidos são exclusivamente cetogênicos?

**11. Um defeito genético no metabolismo dos aminoácidos: história de um caso.** Uma criança de dois anos de idade foi levada ao hospital. Sua mãe contou que ela vomitava com frequência, especialmente após as refeições. O peso da criança e seu desenvolvimento físico estavam aquém do normal. Seu cabelo, embora escuro, continha mechas esbranquiçadas. Uma amostra de urina foi tratada com cloreto férrico ($FeCl_3$) e produziu a cor verde característica da presença de fenilpiruvato. A análise quantitativa de amostras de urina produziu os resultados mostrados na tabela abaixo.

| | Concentração (mM) | |
|---|---|---|
| **Substância** | **Urina do paciente** | **Urina normal** |
| Fenilalanina | 7,0 | 0,01 |
| Fenilpiruvato | 4,8 | 0 |
| Fenil-lactato | 10,3 | 0 |

(a) Sugira qual enzima pode estar deficiente nesta criança. Proponha um tratamento.

(b) Por que a fenilalanina aparece na urina em grandes quantidades?

(c) Qual a origem do fenilpiruvato e do fenil-lactato? Por que essa rota (normalmente não funcional) é acionada quando a concentração de fenilalanina aumenta?

(d) Por que os cabelos da criança contêm mechas esbranquiçadas?

**12. Papel da cobalamina no catabolismo dos aminoácidos.** A anemia perniciosa é causada por prejuízo na absorção de vitamina $B_{12}$. Qual o efeito desse prejuízo sobre o catabolismo dos aminoácidos? Todos os aminoácidos são igualmente afetados? (Dica: ver Quadro 17-2.)

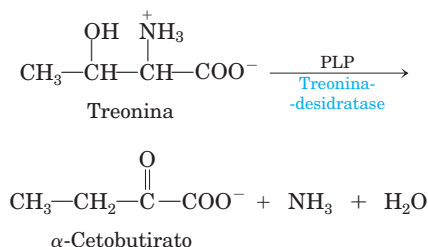
**13. Dietas vegetarianas.** Dietas vegetarianas podem fornecer altos níveis de antioxidantes e um perfil lipídico que pode ajudar a prevenir doença coronariana. Contudo, alguns problemas associados podem advir. Amostras sanguíneas foram colhidas de um grande grupo de participantes voluntários que eram vegetarianos estritos (não consomem qualquer produto de origem animal), lactovegetarianos (vegetarianos que consomem laticínios) ou omnívoros (pessoas com dieta normal e variada, incluindo carne). Todos os participantes haviam seguido sua dieta por diversos anos. Os níveis sanguíneos de homocisteína e metilmalonato estavam elevados no grupo de vegetarianos estritos, um pouco mais baixos no grupo de lactovegetarianos e bem mais baixos no grupo omnívoro. Explique.

**14. Anemia perniciosa.** A deficiência de vitamina $B_{12}$ pode ser causada por raras doenças genéticas que levam a níveis diminuídos de vitamina $B_{12}$ apesar de uma dieta normal, que inclui carne e laticínios, ricos em $B_{12}$. Essas condições não podem ser tratadas com suplementos de vitamina $B_{12}$. Explique.

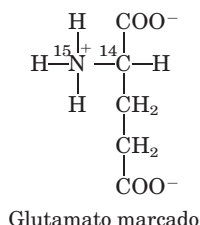
**15. Mecanismos de reação do piridoxal-fosfato.** A treonina pode ser clivada pela enzima treonina-desidratase, que catalisa a conversão de treonina em $\alpha$-cetobutirato e amônia. A enzima utiliza piridoxal-fosfato como cofator. Sugira um mecanismo para essa reação, com base nos mecanismos mostrados na Figura 18-6. Observe que essa reação inclui uma eliminação no carbono $\beta$ da treonina.

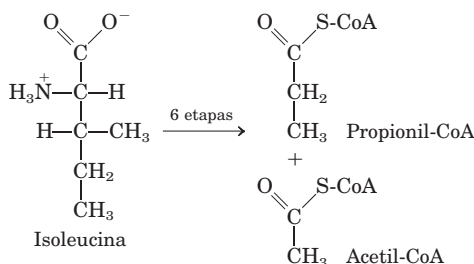
$$CH_3-CH(OH)-CH(\overset{+}{N}H_3)-COO^- \xrightarrow[\text{Treonina-desidratase}]{PLP} CH_3-CH_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-COO^- + NH_3 + H_2O$$

Treonina

α-Cetobutirato

**16. Rotas para o carbono e para o nitrogênio no metabolismo do glutamato.** Quando [2-$^{14}$C,$^{15}$N]glutamato sofre degradação oxidativa no fígado de um rato, em quais átomos dos seguintes metabólitos será encontrado cada um dos isótopos: (a) ureia, (b) succinato, (c) arginina, (d) citrulina, (e) ornitina, (f) aspartato?

$$H_3\overset{15+}{N}-\overset{14}{C}H(COO^-)-CH_2-CH_2-COO^-$$

Glutamato marcado

**17. Estratégia química para o catabolismo da isoleucina.** A isoleucina é degradada por meio de seis etapas, produzindo propionil-CoA e acetil-CoA.

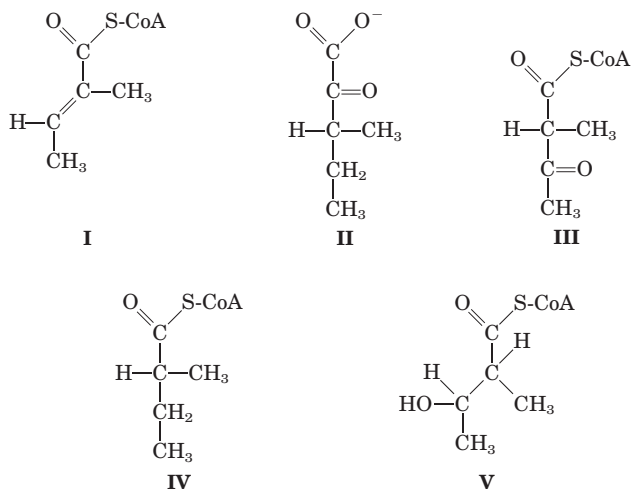
$$\underset{\text{Isoleucina}}{^-OOC-CH(\overset{+}{N}H_3)-CH(CH_3)-CH_2-CH_3} \xrightarrow{\text{6 etapas}} \underset{\text{Propionil-CoA}}{CoA\text{-}S-CO-CH_2-CH_3} + \underset{\text{Acetil-CoA}}{CoA\text{-}S-CO-CH_3}$$

(a) O processo químico da degradação da isoleucina inclui estratégias análogas àquelas utilizadas no ciclo do ácido cítrico e na $\beta$-oxidação dos ácidos graxos. Os intermediários da degradação da isoleucina (I a V), mostrados abaixo, não estão na ordem correta. Utilize seu conhecimento e sua compreensão do ciclo do ácido cítrico e da via de $\beta$-oxidação para colocar em ordem os intermediários na sequência metabólica apropriada para a degradação da isoleucina.

I: $CoA\text{-}S-CO-C(CH_3)=CH-CH_3$

II: $^-OOC-C(=O)-CH(CH_3)-CH_2-CH_3$

III: $CoA\text{-}S-CO-CH(CH_3)-C(=O)-CH_3$

IV: $CoA\text{-}S-CO-CH(CH_3)-CH_2-CH_3$

V: $CoA\text{-}S-CO-CH(CH_3)-CH(OH)-CH_3$

(b) Para cada etapa que você propõe, descreva o processo químico, forneça um exemplo análogo a partir do ciclo do ácido cítrico ou da via de $\beta$-oxidação (onde possível) e indique os cofatores necessários.

**18. Papel do piridoxal-fosfato no metabolismo da glicina.** A enzima serina-hidroximetil-transferase requer piridoxal-fosfato como seu cofator. Proponha um mecanismo para a reação catalisada por essa enzima, no sentido da degradação da serina (produção de glicina). (Dica: ver Figuras 18-19 e 18-20b.)

**19. Vias paralelas para a degradação de aminoácidos e de ácidos graxos.** O esqueleto de carbono da leucina é degradado por uma série de reações bastante análogas àquelas do ciclo do ácido cítrico e da rota de $\beta$-oxidação. Para cada reação, de (a) a (f), mostrada a seguir, indique o tipo de reação, forneça um exemplo análogo a partir do ácido cítrico ou da rota de $\beta$-oxidação (onde possível) e indique os cofatores necessários.

$CH_3-CH(CH_3)-CH_2-CH(\overset{+}{N}H_3)-COO^-$ Leucina

↓ (a)

$CH_3-CH(CH_3)-CH_2-C(=O)-COO^-$ α-Cetoisocaproato

↓ (b) CoA-SH → $CO_2$

$CH_3-CH(CH_3)-CH_2-C(=O)-S\text{-}CoA$ Isovaleril-CoA

↓ (c)

$CH_3-C(CH_3)=CH-C(=O)-S\text{-}CoA$ β-Metilcrotonil-CoA

↓ (d) $HCO_3^-$

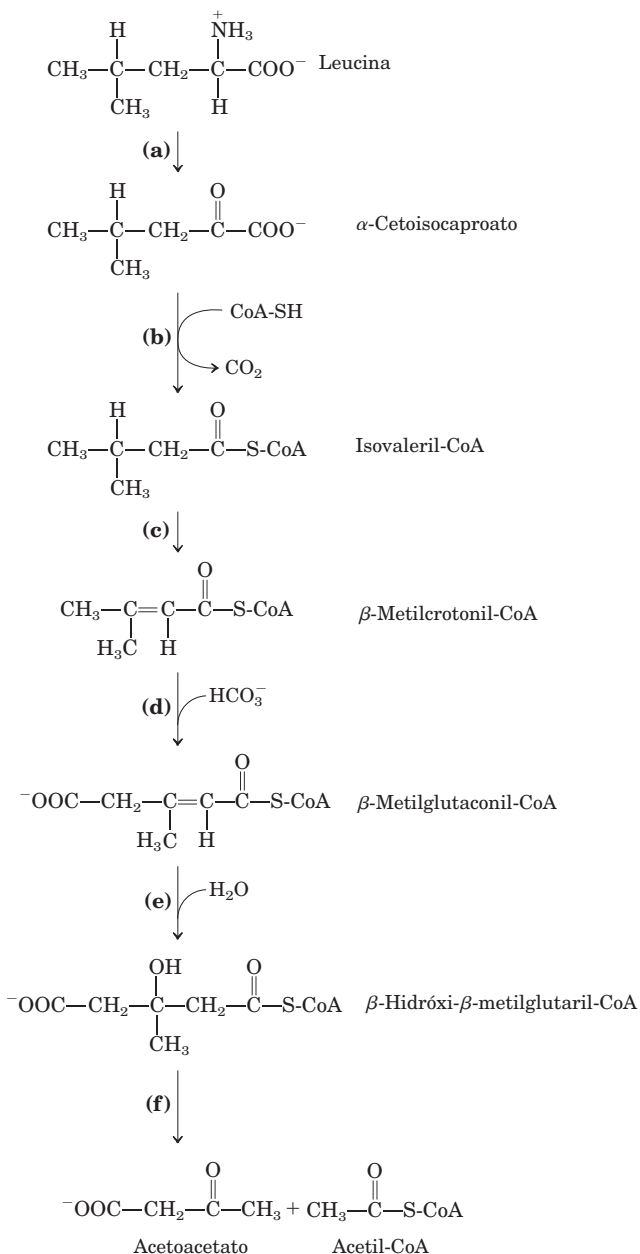
$^-OOC-CH_2-C(CH_3)=CH-C(=O)-S\text{-}CoA$ β-Metilglutaconil-CoA

↓ (e) $H_2O$

$^-OOC-CH_2-C(OH)(CH_3)-CH_2-C(=O)-S\text{-}CoA$ β-Hidróxi-β-metilglutaril-CoA

↓ (f)

$^-OOC-CH_2-C(=O)-CH_3 + CH_3-C(=O)-S\text{-}CoA$

Acetoacetato    Acetil-CoA

## Problema de análise de dados

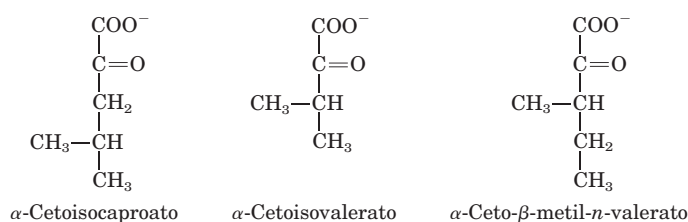
**20. Doença do xarope de bordo.** A Figura 18-28 mostra a rota para a degradação dos aminoácidos de cadeia ramificada e o sítio do defeito bioquímico que causa a doença do xarope de bordo. Os achados iniciais que, por fim, levaram à descoberta desse defeito foram apresentados em três artigos publicados no final da década de 1950 e no início da década de 1960. Este problema conta a história dos achados, desde as observações clínicas iniciais até a proposta de um mecanismo bioquímico.

Menkes, Hurst e Craig (1954) apresentaram os casos de quatro irmãos, os quais morreram após um curso similar de sintomas. Em todos os quatro casos, a gestação e o nascimento foram normais. Os primeiros 3 a 5 dias de vida de cada criança também foram normais. Logo após, porém, cada criança começou a apresentar convulsões, e as crianças morreram entre as idades de 11 dias e três meses. A necropsia mostrou, em todos os casos, considerável edema do encéfalo. A urina das crianças apresentava um odor forte e incomum de "xarope de bordo", iniciando ao redor do terceiro dia de vida.

Menkes (1959) relatou dados coletados de seis outras crianças. Todas apresentaram sintomas semelhantes àqueles descritos anteriormente e morreram entre 15 dias e 20 meses após o nascimento. Em um dos casos, Menkes conseguiu obter amostras de urina durante os últimos meses de vida do bebê. Quando ele tratou a urina com 2,4-dinitrofenil-hidrazona, que forma um precipitado colorido com compostos cetônicos, ele descobriu três $\alpha$-cetoácidos em quantidades anormalmente altas:

$COO^-$—$C{=}O$—$CH_2$—$CH(CH_3)$—$CH_3$
$\alpha$-Cetoisocaproato

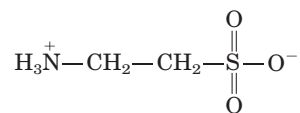
$COO^-$—$C{=}O$—$CH(CH_3)$—$CH_3$
$\alpha$-Cetoisovalerato

$COO^-$—$C{=}O$—$CH(CH_3)$—$CH_2$—$CH_3$
$\alpha$-Ceto-$\beta$-metil-$n$-valerato

(a) Esses $\alpha$-cetoácidos são produzidos pela desaminação de aminoácidos. Para cada um dos $\alpha$-cetoácidos acima, desenhe e nomeie o aminoácido do qual ele é derivado.

Dancis, Levitz e Westall (1960) coletaram dados adicionais, que os levaram a propor o defeito bioquímico mostrado na Figura 18-28. Em um dos casos, examinaram um paciente cuja urina apresentou pela primeira vez odor de xarope de bordo quando ele tinha quatro meses de idade. Com dez meses de idade (março de 1956), o bebê foi internado em um hospital por apresentar febre e desenvolvimento motor bastante retardado. Com a idade de 20 meses (janeiro de 1957), voltou a ser internado, e descobriu-se que apresentava sintomas de degeneração neurológica semelhantes aos observados previamente em casos da doença do xarope de bordo; ele morreu pouco tempo após. Resultados da análise de seu sangue e urina são mostrados na tabela da página 729, juntamente com os valores normais para cada composto.

| | Urina (mg/24 h) | | | Plasma (mg/mL) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Normal | Paciente | | Normal | Paciente |
| Aminoácido(s) | | Março 1956 | Janeiro 1957 | | Janeiro 1957 |
| Alanina | 5-15 | 0,2 | 0,4 | 3,0-4,8 | 0,6 |
| Asparagina e glutamina | 5-15 | 0,4 | 0 | 3,0-5,0 | 2,0 |
| Ácido aspártico | 1-2 | 0,2 | 1,5 | 0,1-0,2 | 0,04 |
| Arginina | 1,5-3 | 0,3 | 0,7 | 0,8-1,4 | 0,8 |
| Cistina | 2-4 | 0,5 | 0,3 | 1,0-1,5 | 0 |
| Ácido glutâmico | 1,5-3 | 0,7 | 1,6 | 1,0-1,5 | 0,9 |
| Glicina | 20-40 | 4,6 | 20,7 | 1,0-2,0 | 1,5 |
| Histidina | 8-15 | 0,3 | 4,7 | 1,0-1,7 | 0,7 |
| Isoleucina | 2-5 | 2,0 | 13,5 | 0,8-1,5 | 2,2 |
| Leucina | 3-8 | 2,7 | 39,4 | 1,7-2,4 | 14,5 |
| Lisina | 2-12 | 1,6 | 4,3 | 1,5-2,7 | 1,1 |
| Metionina | 2-5 | 1,4 | 1,4 | 0,3-0,6 | 2,7 |
| Ornitina | 1-2 | 0 | 1,3 | 0,6-0,8 | 0,5 |
| Fenilalanina | 2-4 | 0,4 | 2,6 | 1,0-1,7 | 0,8 |
| Prolina | 2-4 | 0,5 | 0,3 | 1,5-3,0 | 0,9 |
| Serina | 5-15 | 1,2 | 0 | 1,3-2,2 | 0,9 |
| Taurina | 1-10 | 0,2 | 18,7 | 0,9-1,8 | 0,4 |
| Treonina | 5-10 | 0,6 | 0 | 1,2-1,6 | 0,3 |
| Triptofano | 3-8 | 0,9 | 2,3 | Não medido | 0 |
| Tirosina | 4-8 | 0,3 | 3,7 | 1,5-2,3 | 0,7 |
| Valina | 2-4 | 1,6 | 15,4 | 2,0-3,0 | 13,1 |

(b) A tabela inclui a taurina, aminoácido normalmente não encontrado em proteínas. A taurina frequentemente é produzida como produto colateral de dano celular. Sua estrutura é:

$$H_3\overset{+}{N}—CH_2—CH_2—\underset{\underset{O}{\|}}{\overset{\overset{O}{\|}}{S}}—O^-$$

Com base nessa estrutura e na informação contida neste capítulo, qual aminoácido é, mais provavelmente, o precursor da taurina? Explique seu raciocínio.

(c) Em comparação com os valores normais fornecidos na tabela, quais aminoácidos mostraram níveis significativamente elevados no sangue do paciente em janeiro de 1957? Quais estavam elevados na urina?

Dancis e colaboradores, com base em seus resultados e no conhecimento que tinham da via mostrada na Figura 18-28, concluíram que "embora pareça bastante provável para os autores que o bloqueio primário esteja na via de degradação metabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada, isso não pode ser considerado completamente estabelecido".

(d) Como os dados aqui apresentados apoiam essa conclusão?

(e) Quais dados aqui apresentados *não* se ajustam a esse modelo da doença do xarope de bordo? Como você explica esses dados aparentemente contraditórios?

(f) Que dados você precisaria coletar para estar mais seguro em sua conclusão?

## Referências

**Dancis, J., Levitz, M. & Westall, R.** (1960) Maple syrup urine disease: branched-chain keto-aciduria. *Pediatrics* **25**, 72-79.

**Menkes, J.H.** (1959) Maple syrup disease: isolation and identification of organic acids in the urine. *Pediatrics* **23**, 348-353.

**Menkes, J.H., Hurst, P.L. & Craig, J.M.** (1954) A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics* **14**, 462-466.

19

# Fosforilação Oxidativa e Fotofosforilação



A fosforilação oxidativa é a culminação do metabolismo produtor de energia em organismos aeróbios. Todos os passos oxidativos na degradação de carboidratos, gorduras e aminoácidos convergem para esse estágio final da respiração celular, onde a energia da oxidação governa a síntese de ATP. A fotofosforilação é a maneira pela qual os organismos fotossintéticos capturam a energia do sol – a fonte, em última análise, da energia na biosfera – e a utilizam para produzir ATP. Juntas, a fosforilação oxidativa e a fotofosforilação são responsáveis pela maior parte do ATP sintetizado na maioria dos organismos, na maior parte do tempo.

Em eucariotos, a fosforilação oxidativa ocorre nas mitocôndrias e a fotofosforilação nos cloroplastos. As vias de síntese de ATP em mitocôndrias e cloroplastos desafiaram e fascinaram bioquímicos por mais de meio século, e esse fascínio aumentou com o aprofundamento do reconhecimento desses mecanismos fundamentais em organismos vivos, de sua conservação ao longo da evolução e de suas bases estruturais.

O entendimento atual sobre a síntese de ATP em mitocôndrias e cloroplastos tem como base a hipótese, introduzida por Peter Mitchell em 1961, de que diferenças transmembrana na concentração de prótons servem de reservatório para a energia extraída das reações biológicas de oxidação. A **teoria quimiosmótica** foi aceita como um dos grandes princípios unificadores da biologia do século XX. Ela fornece uma visão dos processos de fosforilação oxidativa e de fotofosforilação, assim como de transduções de energia aparentemente diferentes, como o transporte ativo através de membranas e o movimento de flagelos de bactérias.

A fosforilação oxidativa e a fotofosforilação têm mecanismos semelhantes em três aspectos (**Figura 19-1**). (1) Os dois processos envolvem o fluxo de elétrons por meio de uma cadeia de transportadores da membrana; (2) a energia livre que se torna disponível por esse fluxo de elétrons "montanha abaixo" (exergônico) é acoplada ao transporte "montanha acima" de prótons através de uma membrana impermeável a prótons, conservando a energia livre da oxidação do combustível na forma de um potencial eletroquímico transmembrana (p. 403); (3) o fluxo transmembrana de retorno dos prótons a favor de seu gradiente de concentração por canais proteicos específicos fornece a energia livre para a síntese de ATP, catalisada por um complexo proteico presente na membrana (ATP-sintase), que acopla o fluxo de prótons à fosforilação do ADP.

Este capítulo começa com a fosforilação oxidativa mitocondrial. Primeiro, são descritos os componentes da cadeia de transferência de elétrons, sua organização em grandes complexos funcionais na membrana mitocondrial interna, a via de fluxo de elétrons por eles e os movimentos de prótons que acompanham esse fluxo. Depois é abordado o notável complexo enzimático que, por catálise rotacional, captura a energia do fluxo de prótons na forma de ATP, e os mecanismos regulatórios que coordenam a fosforilação oxidativa com as várias vias catabólicas pelas quais os combustíveis são oxidados.

O papel metabólico das mitocôndrias é tão crucial para o funcionamento da célula e do organismo que defeitos na função mitocondrial têm consequências médicas muito sérias. As mitocôndrias são centrais para as funções neuronal e muscular e para a regulação do metabolismo energético do corpo como um todo e do peso corporal. Doenças humanas neurodegenerativas, assim como cân-

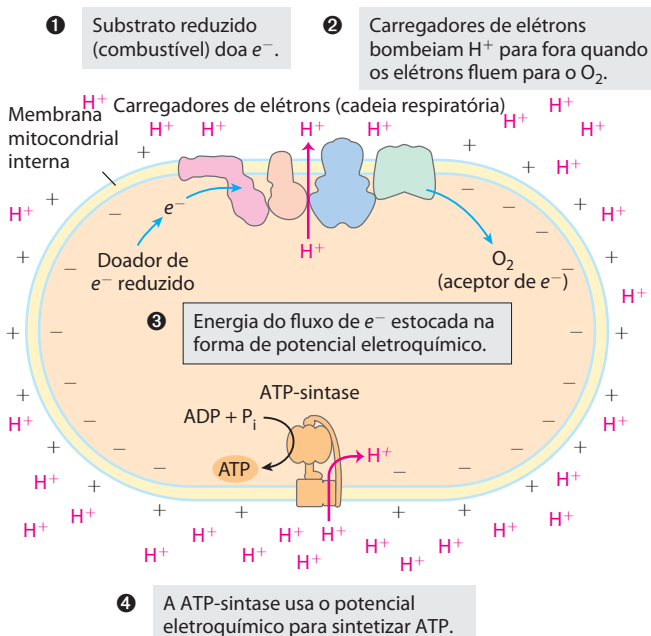
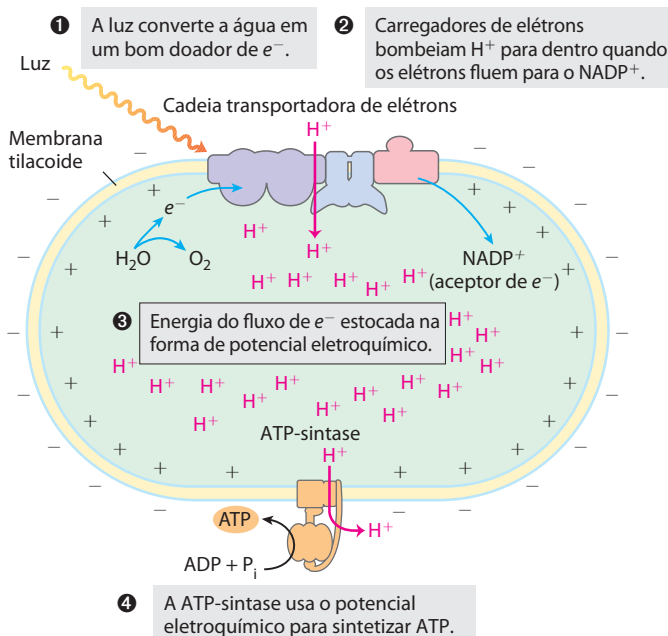



**FIGURA 19-1 O mecanismo químiosmótico para a síntese de ATP. (a)** Em mitocôndrias, os elétrons se movem por uma cadeia de transportadores ligados a membranas (a cadeia respiratória) espontaneamente, governados pelo alto potencial de redução do oxigênio e pelos potenciais de redução relativamente baixos dos diversos substratos reduzidos (combustível) que sofrem oxidação na mitocôndria. **(b)** Em cloroplastos, o movimento de elétrons por uma cadeia de carregadores ligados a membranas é impulsionado pela energia dos fótons absorvidos pelo pigmento verde clorofila. Em ambas as organelas, o fluxo de elétrons cria um potencial eletroquímico pelo movimento transmembrana de prótons e carga positiva. Em ambos os casos, o potencial eletroquímico governa a síntese de ATP por meio de uma enzima de membrana, ATP-sintase, fundamentalmente similar em mitocôndrias e cloroplastos, assim como em bactérias e arqueobactérias.

cer, diabetes e obesidade, são reconhecidas como possíveis resultados do comprometimento da função mitocondrial, e uma teoria de envelhecimento baseia-se na perda gradual da integridade mitocondrial. A produção de ATP não é a única função importante da mitocôndria; essa organela também age na termogênese, síntese de esteroides e apoptose (morte celular programada). A descoberta dessas funções variadas e importantes das mitocôndrias estimulou uma boa parte da pesquisa atual sobre a bioquímica dessa organela.

Depois de discutir as diversas funções mitocondriais, agora é possível estudar a fotofosforilação, concentrando-se primeiro na absorção de luz pelos pigmentos fotossintéticos e depois no fluxo de elétrons (promovido pela luz) de $H_2O$ para $NADP^+$ e nas bases moleculares do acoplamento entre o fluxo de elétrons e de prótons. São também analisadas as semelhanças de estrutura e mecanismo entre ATP-sintases de cloroplastos e de mitocôndrias, assim como a base evolutiva para a conservação desse mecanismo. A capacidade notável dos cloroplastos em fazer ATP por meio da oxidação de um composto de disponibilidade ilimitada (água), ao mesmo tempo em que produz um composto essencial à vida da maioria dos animais (oxigênio), coloca um conjunto de desafios igualmente fascinantes aos biólogos, bioquímicos e químicos. A determinação das estruturas de complexos supramoleculares que realizam esses processos nos cloroplastos forneceu pistas físicas e químicas para o entendimento do processo da fotossíntese.

# FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

## 19.1 Reações de transferência de elétrons em mitocôndrias

Albert L. Lehninger, 1917–1986

A descoberta em 1948 por Eugene Kennedy e Albert Lehninger de que as mitocôndrias são os locais da fosforilação oxidativa em eucariotos marcou o início da fase moderna dos estudos de transduções biológicas de energia. As mitocôndrias, assim como as bactérias gram-negativas, têm duas membranas (**Figura 19-2a**). A membrana mitocondrial externa é prontamente permeável a moléculas pequenas ($M_r < 5.000$) e a íons, que se movem livremente por canais transmembrana, formados por uma família de proteínas integrais de membrana chamadas de porinas. A membrana interna é impermeável à maioria das moléculas pequenas e dos íons, incluindo prótons ($H^+$); as únicas espécies que cruzam a membrana o fazem por meio de transportadores específicos. A membrana interna aloja os componentes da cadeia respiratória e a ATP-sintase.

A matriz mitocondrial, delimitada pela membrana interna, contém o complexo da piruvato-desidrogenase e as

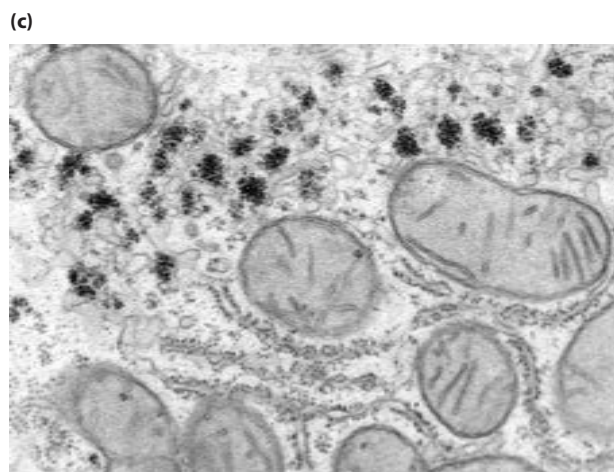
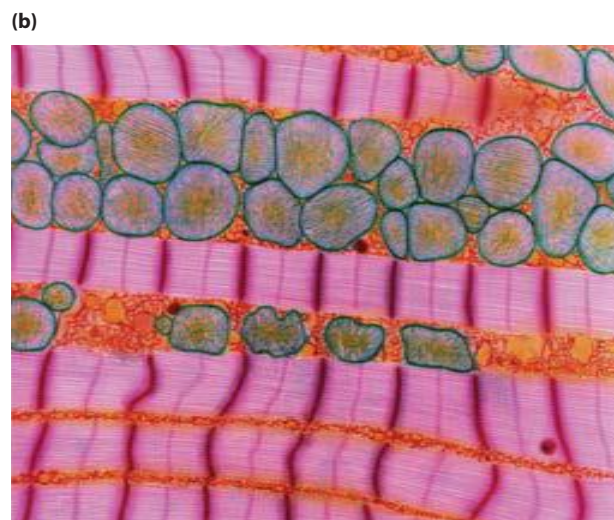
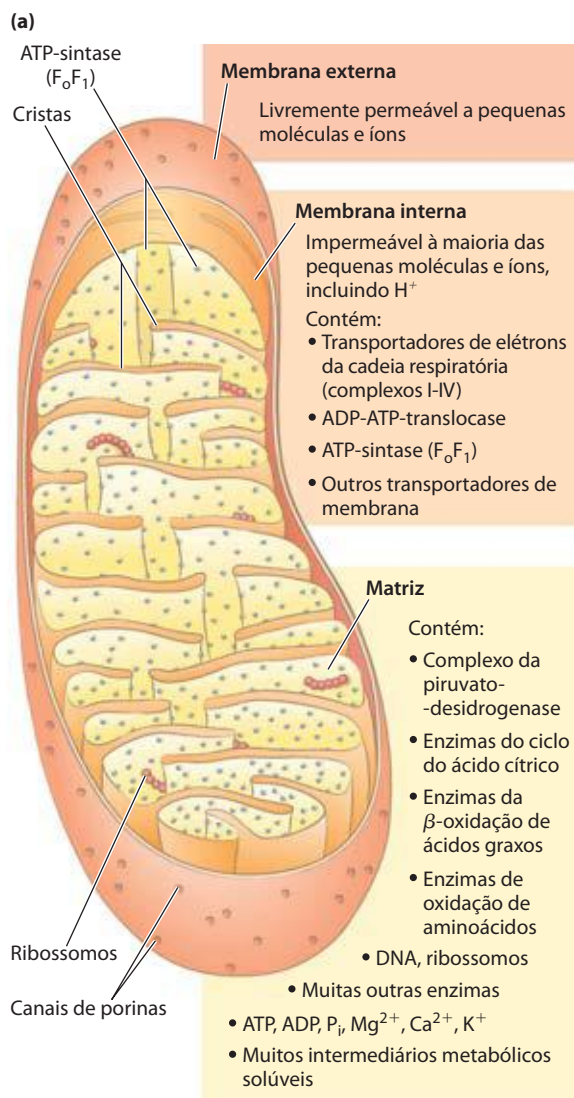



**FIGURA 19-2 Anatomia bioquímica de uma mitocôndria. (a)** A membrana externa tem poros que a tornam permeável a pequenas moléculas e íons, mas não a proteínas. As convoluções (cristas) da membrana interna fornecem uma grande área de superfície. A membrana interna de uma única mitocôndria do fígado pode ter mais de 10.000 conjuntos de sistemas de transferência de elétrons (cadeias respiratórias) e de moléculas de ATP-sintase distribuídos na superfície da membrana. **(b)** As mitocôndrias do músculo cardíaco, que têm cristas mais profusas e, assim, uma área muito maior de membrana interna, contêm mais de três vezes o número de conjuntos de sistemas de transferência de elétrons que as **(c)** mitocôndrias do fígado. As mitocôndrias dos músculos e do fígado têm tamanho aproximado ao de uma bactéria – 1 a 2 $\mu$m de comprimento. As mitocôndrias de invertebrados, de plantas e de microrganismos eucariotos são semelhantes àquelas aqui mostradas, mas com variações muito maiores no tamanho, na forma e no grau de convoluções da membrana interna.

enzimas do ciclo do ácido cítrico, a via de $\beta$-oxidação de ácidos graxos e as vias de oxidação de aminoácidos – todas as vias de oxidação de combustível, exceto a glicólise, que ocorre no citosol. A permeabilidade seletiva da membrana interna segrega os intermediários e as enzimas das vias metabólicas citosólicas daqueles dos processos metabólicos que ocorrem na matriz. No entanto, transportadores específicos carregam piruvato, ácidos graxos e aminoácidos ou seus $\alpha$-cetoácidos derivados para dentro da matriz, para acesso à maquinaria do ciclo do ácido cítrico. ADP e $P_i$ são especificamente transportados para dentro da matriz quando ATP recém-sintetizado é transportado para fora. O melhor inventário atual de proteínas em mitocôndrias de mamíferos lista cerca de 1.100, das quais, pelo menos, 300 têm funções desconhecidas. A representação de mitocôndrias em forma de feijão na Figura 19-2 é uma grande simplificação, derivada, em parte, de estudos antigos, nos quais finas secções de células eram observadas em microscópio eletrônico. Imagens tridimensionais obtidas ou por reconstrução a partir de secções seriadas ou por microscopia confocal, revelam uma variação maior no tamanho e na forma mitocondriais. Em células vivas coradas com corantes fluorescentes específicos de mitocôndria, são vistos grandes números de mitocôndrias de formas variadas, aglomeradas perto do núcleo (ver Fig. 19-42). Tecidos com uma grande demanda por metabolismo aeróbio (p. ex., cérebro, músculos esquelético e do coração e olho) contêm muitas centenas ou milhares de mitocôndrias por célula, e,

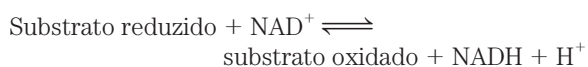
em geral, as mitocôndrias das células com grande atividade metabólica têm cristas mais e mais densamente empacotadas (Fig. 19-1b). Em tecidos com metabolismo menos ativo (p. ex., pele), há menos mitocôndrias, cada uma com menos cristas. Durante o crescimento e divisão celulares, as mitocôndrias dividem-se por fissão (como as bactérias), e, sob algumas circunstâncias, mitocôndrias individuais se fundem para formar estruturas maiores e mais distendidas.

## Elétrons são canalizados para aceptores universais de elétrons

A fosforilação oxidativa começa com a entrada de elétrons na cadeia de carregadores de elétrons, chamada de **cadeia respiratória**. A maioria desses elétrons surge da ação das desidrogenases, que coletam elétrons das vias catabólicas e os canalizam para aceptores universais de elétrons – nucleotídeos de nicotinamida ($NAD^+$ ou $NADP^+$) ou nucleotídeos de flavina (FMN ou FAD) (ver Figuras 13-24, 13-27).

**Desidrogenases ligadas a nucleotídeos de nicotinamida** catalisam reações reversíveis dos seguintes tipos gerais:

$$\text{Substrato reduzido} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{substrato oxidado} + NADH + H^+$$

$$\text{Substrato reduzido} + NADP^+ \rightleftharpoons \text{substrato oxidado} + NADPH + H^+$$

A maioria das desidrogenases que agem no catabolismo é específica para $NAD^+$ como aceptor de elétrons (Tabela 19-1). Algumas estão no citosol, outras estão nas mitocôndrias e ainda outras têm isoenzimas mitocondriais e citosólicas.

Desidrogenases ligadas ao $NAD^+$ removem dois átomos de hidrogênio de seus substratos. Um deles é transferido como íon hidreto ($:H^-$) ao $NAD^+$; o outro é liberado como $H^+$ no meio (ver Figura 13-24). NADH e NADPH são carregadores de elétrons solúveis em água, que se associam *reversivelmente* com desidrogenases. O NADH carrega elétrons das reações catabólicas até seu ponto de entrada na cadeia respiratória, o complexo da NADH-desidrogenase descrito a seguir. O NADPH geralmente supre elétrons para reações anabólicas. As células mantêm conjuntos separados de NADPH e NADH, com diferentes potenciais redox. Isso é alcançado mantendo-se a razão de [forma reduzida] / [forma oxidada] relativamente alta para NADPH e relativamente baixa para NADH. Nenhum desses nucleotídeos pode atravessar a membrana mitocondrial interna, mas os elétrons que eles carregam podem ser lançados através dela indiretamente, como será visto.

**Flavoproteínas** contêm um nucleotídeo de flavina, FMN ou FAD (ver Figura 13-27), muito fortemente ligado, às vezes de forma covalente. O nucleotídeo de flavina oxidado pode aceitar um elétron (produzindo a forma semiquinona) ou dois elétrons (produzindo $FADH_2$ ou $FMNH_2$). A transferência de elétrons ocorre porque a flavoproteína tem um potencial de redução maior do que o composto oxidado. Lembre-se de que o potencial de redução é uma medida quantitativa da tendência relativa de uma determinada espécie química de aceitar elétrons em uma reação de oxidação-redução (p. 530). O potencial de redução padrão de um nucleotídeo de flavina, ao contrário daquele de NAD ou NADP, depende da proteína com a qual está associado. Interações locais com grupos funcionais na proteína distorcem os orbitais de elétrons no anel de flavina, mudando as estabilidades relativas das formas reduzidas e oxidadas. O potencial de redução padrão relevante é, portanto, aquele da flavoproteína em particular e não o do FAD ou do FMN isolados. O nucleotídeo de flavina deve ser considerado parte do sítio ativo da flavoproteína, em vez de um reagente ou produto na reação de transferência de elétrons. Como as flavoproteínas participam de transferências de um ou dois elétrons, elas servem de

**TABELA 19-1** Algumas reações importantes catalisadas por desidrogenases ligadas a NAD(P)H

| Reação* | Localização[†] |
|---|---|
| **Ligadas ao NAD** | |
| $\alpha$-Cetoglutarato + CoA + $NAD^+$ $\rightleftharpoons$ succinil-CoA + $CO_2$ + NADH + $H^+$ | M |
| L-Malato + $NAD^+$ $\rightleftharpoons$ oxaloacetato + NADH + $H^+$ | M e C |
| Piruvato + CoA + $NAD^+$ $\rightleftharpoons$ acetil-CoA + $CO_2$ + NADH + $H^+$ | M |
| Gliceraldeído-3-fosfato + $P_i$ + $NAD^+$ $\rightleftharpoons$ 1,3-bifosfoglicerato + NADH + $H^+$ | C |
| Lactato + $NAD^+$ $\rightleftharpoons$ piruvato + NADH + $H^+$ | C |
| $\beta$-Hidroxiacil-CoA + $NAD^+$ $\rightleftharpoons$ $\beta$-cetoacil-CoA + NADH + $H^+$ | M |
| **Ligadas ao NADP** | |
| Glicose-6-fosfato + $NADP^+$ $\rightleftharpoons$ 6-fosfogliconato + NADPH + $H^+$ | C |
| L-Malato + $NADP^+$ $\rightleftharpoons$ piruvato + $CO_2$ + NADPH + $H^+$ | C |
| **Ligadas ao NAD ou ao NADP** | |
| L-Glutamato + $H_2O$ + $NAD(P)^+$ $\rightleftharpoons$ $\alpha$-cetoglutarato + $NH_4^+$ + NAD(P)H | M |
| Isocitrato + $NAD(P)^+$ $\rightleftharpoons$ $\alpha$-cetoglutarato + $CO_2$ + NAD(P)H + $H^+$ | M e C |

* Estas reações e suas enzimas são discutidas nos Capítulos 14 a 18.
[†] M designa mitocôndria; C, citosol.

intermediários entre reações nas quais dois elétrons são doados (como em desidrogenações) e aquelas nas quais um elétron é cedido (como na redução de uma quinona a hidroquinona, descrita a seguir).

## Os elétrons passam por uma série de carregadores ligados à membrana

A cadeia respiratória mitocondrial consiste em uma série de carregadores que agem sequencialmente, sendo a maioria deles proteínas integrais com grupos prostéticos capazes de aceitar e doar um ou dois elétrons. Ocorrem três tipos de transferência de elétrons na fosforilação oxidativa: (1) transferência direta de elétrons, como na redução de $Fe^{3+}$ a $Fe^{2+}$, (2) transferência na forma de um átomo de hidrogênio ($H^+ + e^-$), e (3) transferência como um íon hidreto ($:H^-$), que tem dois elétrons. O termo **equivalente redutor** é usado para designar um único elétron equivalente transferido em uma reação de oxidação-redução.

Além do NAD e das flavoproteínas, outros três tipos de moléculas carregadoras de elétrons funcionam na cadeia respiratória: uma quinona hidrofóbica (ubiquinona) e dois tipos diferentes de proteínas que contêm ferro (citocromos e proteínas ferro-enxofre). A **ubiquinona** (também chamada de **coenzima Q**, ou simplesmente **Q**) é uma benzoquinona solúvel em lipídeos, com uma longa cadeia lateral isoprenoide (**Figura 19-3**). Os compostos intimamente relacionados, plastoquinona (de cloroplastos vegetais) e menaquinona (de bactérias) desempenham papéis análogos àquele da ubiquinona, carregando elétrons em cadeias de transferência de elétrons associadas a membranas. A ubiquinona pode aceitar um elétron para se tornar o radical semiquinona ($^{\bullet}$QH) ou dois elétrons para formar ubiquinol ($QH_2$) (Figura 19-3) e, como os carregadores flavoproteínas, atuar na junção entre um doador de dois elétrons e um aceptor de um elétron. Como a ubiquinona é pequena e hidrofóbica, ela é livremente difusível dentro da bicamada lipídica da membrana mitocondrial interna e capaz de movimentar equivalentes redutores entre outros carregadores de elétrons menos móveis na membrana. Além disso, por carregar elétrons e prótons, ela desempenha um papel central em acoplar o fluxo de elétrons ao movimento de prótons.

Os **citocromos** são proteínas com absorção caracteristicamente forte de luz visível, devido aos seus grupos prostéticos heme contendo ferro (**Figura 19-4a**). As mitocôndrias têm três classes de citocromos, designados *a*, *b* e *c*, distinguidos por diferenças em seus espectros de absorção de luz. Cada tipo de citocromo em seu estado reduzido ($Fe^{2+}$) tem três bandas de absorção na faixa visível (Figura 19-4b). A banda de comprimento de onda mais longo é próxima de 600 nm em citocromos tipo *a*, próxima de 560 nm no tipo *b* e perto de 550 nm no tipo *c*. Para distinguir citocromos intimamente relacionados dentro de um determinado tipo, a absorção máxima exata algumas vezes é utilizada nos nomes, como no citocromo $b_{562}$.

Os cofatores heme dos citocromos *a* e *b* são fortemente, mas não covalentemente, ligados às suas proteínas associadas; os hemes dos citocromos tipo *c* são covalentemente ligados por meio de resíduos de Cys (Figura 19-4). Da mesma maneira que no caso das flavoproteínas, o potencial de redução padrão do átomo de ferro do heme

$(CH_2—CH{=}C(CH_3)—CH_2)_{10}—H$

Ubiquinona (Q)
(totalmente oxidada)

$H^+ + e^-$

Radical semiquinona
($^{\bullet}$QH)

$H^+ + e^-$

Ubiquinol ($QH_2$)
(totalmente reduzido)

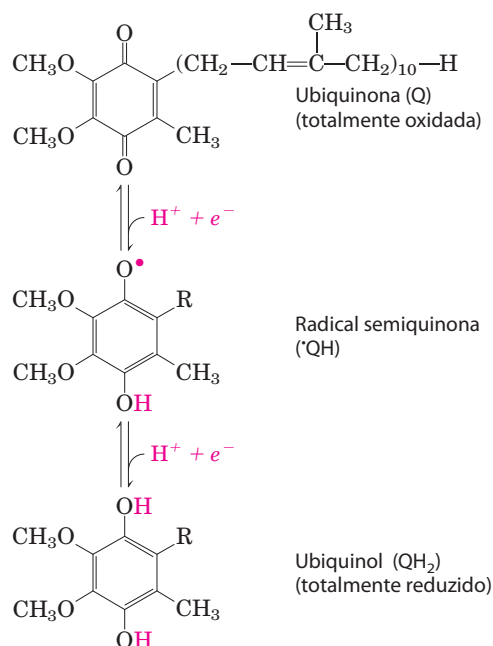



**FIGURA 19-3 Ubiquinona (Q ou coenzima Q).** A redução completa da ubiquinona requer dois elétrons e dois prótons e ocorre em duas etapas por meio do intermediário, o radical semiquinona.

de um citocromo depende de sua interação com as cadeias laterais da proteína, sendo, portanto, diferente para cada citocromo. Os citocromos dos tipos *a* e *b* e alguns do tipo *c* são proteínas integrais da membrana mitocondrial interna. Uma exceção marcante é o citocromo *c* das mitocôndrias, proteína solúvel que se associa com a superfície externa da membrana interna por meio de interações eletrostáticas.

Em **proteínas ferro-enxofre**, o ferro está ausente no heme, mas encontra-se em associação com átomos de enxofre inorgânico, ou com átomos de enxofre dos resíduos de Cys na proteína, ou com ambos. Esses centros de ferro-enxofre (Fe-S) variam de estruturas simples, com um único átomo de Fe coordenado com quatro grupos Cys—SH, a centros Fe-S mais complexos, com dois ou quatro átomos de Fe (**Figura 19-5**). **Proteínas ferro-enxofre de Rieske** (denominadas em homenagem a seu descobridor, John S. Rieske) são uma variação nesse tema, onde um átomo de Fe está combinado com dois resíduos de His em vez de com resíduos de Cys. Todas as proteínas ferro-enxofre participam de transferências de um elétron, nas quais um átomo de ferro do aglomerado ferro-enxofre é oxidado ou reduzido. Pelo menos oito proteínas Fe-S funcionam na transferência mitocondrial de elétrons. O potencial de redução das proteínas Fe-S varia de −0,65 V a +0,45 V, dependendo do microambiente do ferro dentro da proteína.

Na reação global catalisada pela cadeia respiratória mitocondrial, os elétrons se movem do NADH, succinato ou outro doador primário de elétrons, por flavoproteínas, ubiquinona, proteínas ferro-enxofre e citocromos e, finalmente, ao $O_2$. Uma observação dos métodos utilizados para determinar a sequência em que os carregadores agem é in-

(a)

Ferro protoporfirina IX
(em citocromos tipo *b*)

Heme *c*
(em citocromos tipo *c*)

Heme *a*
(em citocromos tipo *a*)

(b)

Absorção relativa de luz (%)

Cit *c* reduzido

Cit *c* oxidado

Comprimento de onda (nm)

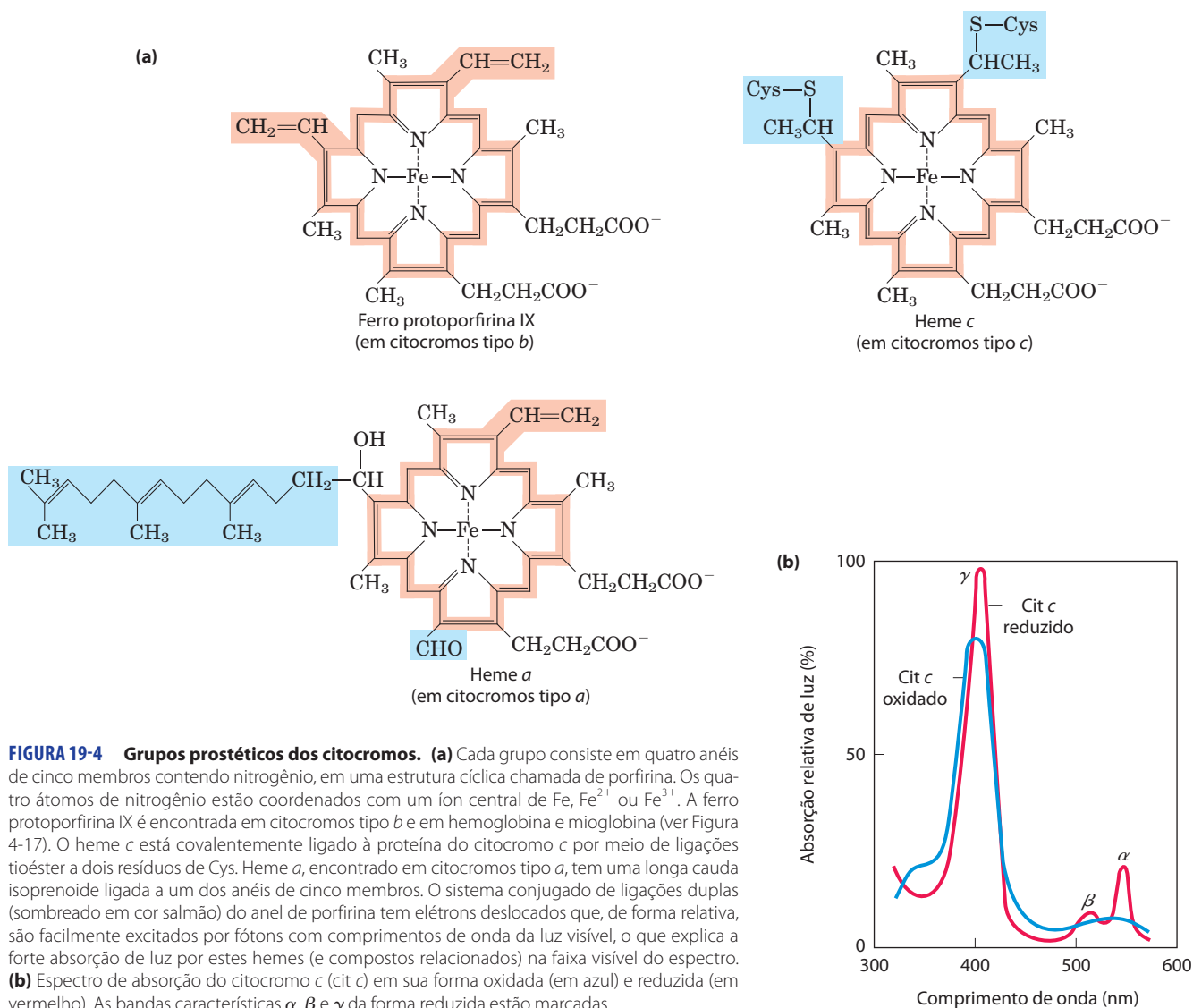



**FIGURA 19-4 Grupos prostéticos dos citocromos. (a)** Cada grupo consiste em quatro anéis de cinco membros contendo nitrogênio, em uma estrutura cíclica chamada de porfirina. Os quatro átomos de nitrogênio estão coordenados com um íon central de Fe, $Fe^{2+}$ ou $Fe^{3+}$. A ferro protoporfirina IX é encontrada em citocromos tipo *b* e em hemoglobina e mioglobina (ver Figura 4-17). O heme *c* está covalentemente ligado à proteína do citocromo *c* por meio de ligações tioéster a dois resíduos de Cys. Heme *a*, encontrado em citocromos tipo *a*, tem uma longa cauda isoprenoide ligada a um dos anéis de cinco membros. O sistema conjugado de ligações duplas (sombreado em cor salmão) do anel de porfirina tem elétrons deslocados que, de forma relativa, são facilmente excitados por fótons com comprimentos de onda da luz visível, o que explica a forte absorção de luz por estes hemes (e compostos relacionados) na faixa visível do espectro. **(b)** Espectro de absorção do citocromo *c* (cit *c*) em sua forma oxidada (em azul) e reduzida (em vermelho). As bandas características $\alpha$, $\beta$ e $\gamma$ da forma reduzida estão marcadas.

formativa, uma vez que as mesmas abordagens gerais foram utilizadas para estudar outras cadeias de transferência de elétrons, como aquelas nos cloroplastos.

Primeiro os potenciais de redução padrão dos carregadores de elétrons individuais foram experimentalmente determinados (Tabela 19-2). Poderia ser esperado que os

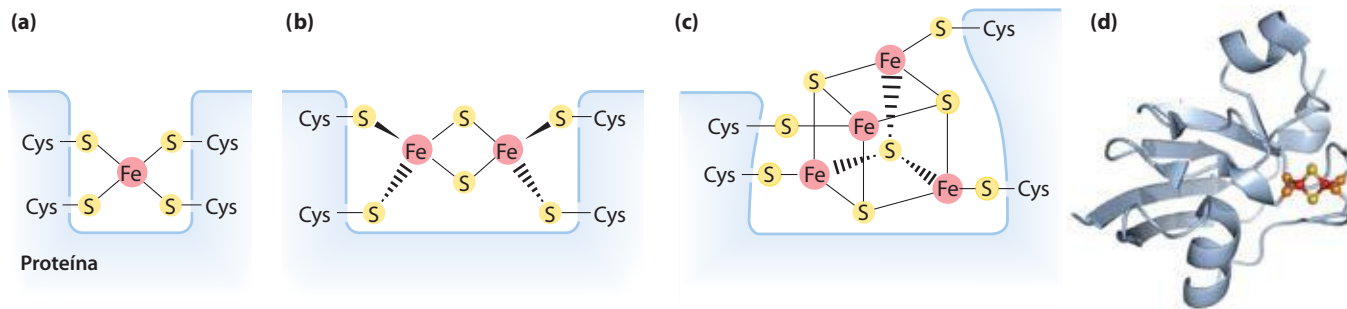



**FIGURA 19-5 Centros de ferro-enxofre.** Os centros Fe-S das proteínas ferro-enxofre podem ser tão simples como em **(a)**, com um único íon de Fe cercado pelos átomos de S de quatro resíduos de Cys. Outros centros incluem átomos de S tanto inorgânicos quanto fornecidos por Cys, como em **(b)** centros 2Fe-2S ou em **(c)** centros 4Fe-4S. **(d)** A ferredoxina da cianobactéria *Anabaena* 7120 tem um centro 2Fe-2S (PDB ID 1FRD); o Fe está representado em vermelho, o S inorgânico em amarelo e o S de Cys em cor de laranja. (Observe que nestas designações apenas os átomos de S inorgânico são contados. Por exemplo, no centro 2Fe-2S (b), cada íon de Fe é na verdade circundado por quatro átomos de S.) O potencial de redução padrão exato do ferro nestes centros depende do tipo de centro e de sua interação com a proteína associada.

**TABELA 19-2** Potenciais de redução padrão da cadeia respiratória e de carregadores de elétrons relacionados

| Reação redox (meia-reação) | $E'°$ (V) |
|---|---|
| $2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2$ | −0,414 |
| $NAD^+ + H^+ + 2e^- \longrightarrow NADH$ | −0,320 |
| $NADP^+ + H^+ + 2e^- \longrightarrow NADPH$ | −0,324 |
| NADH-desidrogenase (FMN) + $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ NADH-desidrogenase ($FMNH_2$) | −0,30 |
| Ubiquinona + $2H^+ + 2e^- \longrightarrow$ ubiquinol | 0,045 |
| Citocromo $b$ ($Fe^{3+}$) + $e^- \longrightarrow$ citocromo $b$ ($Fe^{2+}$) | 0,077 |
| Citocromo $c_1$ ($Fe^{3+}$) + $e^- \longrightarrow$ citocromo $c_1$ ($Fe^{2+}$) | 0,22 |
| Citocromo $c$ ($Fe^{3+}$) + $e^- \longrightarrow$ citocromo $c$ ($Fe^{2+}$) | 0,254 |
| Citocromo $a$ ($Fe^{3+}$) + $e^- \longrightarrow$ citocromo $a$ ($Fe^{2+}$) | 0,29 |
| Citocromo $a_3$ ($Fe^{3+}$) + $e^- \longrightarrow$ citocromo $a_3$ ($Fe^{2+}$) | 0,35 |
| $\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2O$ | 0,8166 |

carregadores funcionassem em ordem crescente de potencial de redução, porque os elétrons tendem a fluir espontaneamente de carregadores de $E'°$ menores para carregadores de $E'°$ maiores. A ordem dos carregadores deduzida por este método é NADH → Q → citocromo $b$ → citocromo $c_1$ → citocromo $c$ → citocromo $a$ → citocromo $a_3$ → $O_2$. Observe, no entanto, que a ordem dos potenciais de redução padrão não é necessariamente a mesma que a ordem de potenciais de redução *reais* sob condições celulares, que depende das concentrações das formas reduzidas e oxidadas (ver Equação 13-5, p. 531). Um segundo método para determinar a sequência de carregadores de elétrons envolve reduzir toda a cadeia de carregadores experimentalmente, fornecendo uma fonte de elétrons, mas nenhum aceptor de elétrons (sem $O_2$). Quando o $O_2$ é repentinamente introduzido no sistema, a taxa com a qual cada carregador de elétrons se torna oxidado (medida espectroscopicamente) revela a ordem em que os carregadores funcionam. O carregador mais próximo do $O_2$ (no final da cadeia) cede seu elétron primeiro, o segundo carregador contado a partir do final é o próximo a ser oxidado, e assim por diante. Tais experimentos confirmaram a sequência deduzida a partir dos potenciais de redução padrão.

Em uma confirmação final, agentes que inibem o fluxo de elétrons ao longo da cadeia foram usados em combinação com medidas do grau de oxidação de cada carregador. Na presença de $O_2$ e de um doador de elétrons, os carregadores que funcionam antes da etapa inibida ficam completamente reduzidos, e aqueles que funcionam depois dessa etapa são completamente oxidados (**Figura 19-6**). Usando diversos inibidores que bloqueiam diferentes etapas da cadeia, os investigadores determinaram a sequência inteira, a mesma deduzida nas duas primeiras abordagens.

## Os carregadores de elétrons atuam em complexos multienzimáticos

Os carregadores de elétrons da cadeia respiratória são organizados em complexos supramoleculares inseridos dentro da membrana, podendo ser fisicamente separados. Um

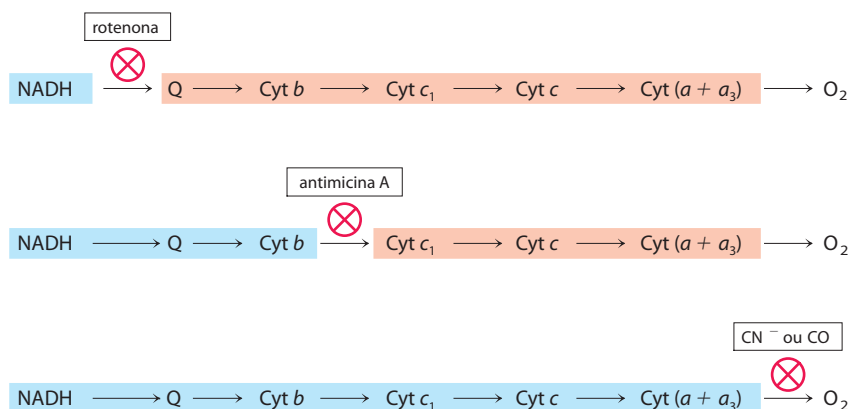



**FIGURA 19-6 Método para a determinação da sequência de carregadores de elétrons.** Este método mede os efeitos de inibidores da transferência de elétrons no estado de oxidação de cada carregador. Na presença de um doador de elétrons e de $O_2$, cada inibidor causa um padrão característico de carregadores oxidados/reduzidos: aqueles antes do bloqueio tornam-se reduzidos (em azul), e aqueles após o bloqueio tornam-se oxidados (em cor salmão).

**TABELA 19-3** Os componentes proteicos da cadeia mitocondrial de transferência de elétrons

| Proteína/complexo enzimático | Massa (kDa) | Número de subunidades* | Grupo(s) prostético(s) |
|---|---|---|---|
| I NADH-desidrogenase | 850 | 43 (14) | FMN, Fe-S |
| II Succinato-desidrogenase | 140 | 4 | FAD, Fe-S |
| III Ubiquinona: citocromo *c*-oxidorredutase | 250 | 11 | Hemes, Fe-S |
| Citocromo *c*† | 13 | 1 | Heme |
| IV Citocromo-oxidase | 160 | 13 (3-4) | Hemes; $Cu_A$, $Cu_B$ |

*Número de subunidades em equivalentes bacterianos entre parênteses.
†O citocromo *c* não é parte do complexo enzimático; ele se move entre os complexos III e IV como proteína livremente solúvel.

leve tratamento da membrana mitocondrial interna com detergentes permite a separação de quatro complexos carregadores singulares, cada um capaz de catalisar a transferência de elétrons por uma porção da cadeia (Tabela 19-3; **Figura 19-7**). Os complexos I e II catalisam a transferência de elétrons para a ubiquinona a partir de dois doadores de elétrons diferentes: NADH (complexo I) e succinato (complexo II). O complexo III carrega elétrons da ubiquinona reduzida para o citocromo *c*, e o complexo IV completa a sequência, transferindo elétrons do citocromo *c* para o $O_2$.

Agora serão estudados com mais detalhe a estrutura e a função de cada complexo da cadeia respiratória mitocondrial.

**Complexo I: NADH à ubiquinona.** A **Figura 19-8** ilustra a relação entre os complexos I e II e as enzimas da $\beta$-oxidação de ácidos graxos e a ubiquinona. O **complexo I**, também chamado de **NADH: ubiquinona-oxidorredutase** ou **NADH-desidrogenase**, é uma enzima grande, composta por 42 cadeias diferentes de polipeptídeos, incluindo uma flavoproteína contendo FMN e pelo menos seis centros de ferro-enxofre. O complexo I tem formato de L, com um braço do L na membrana e o outro se estendendo para a matriz. Conforme mostrado na **Figura 19-9**, o complexo I catalisa dois processos simultâneos e obrigatoriamente acoplados: (1) a transferência exergônica para a ubiquinona de um íon hidreto do NADH e de um próton da matriz, expressa por

$$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{Q} \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{QH}_2 \qquad (19\text{-}1)$$

e (2) a transferência endergônica de quatro prótons da matriz para o espaço intermembrana. O complexo I é, portanto, um bombeador de prótons que utiliza a energia da transferência de elétrons, e a reação que ele catalisa é **vetorial**: ela move prótons em uma direção específica de um local (a matriz, que se torna negativamente carregada com a saída dos prótons) a outro (o espaço intermembrana, que se torna positivamente carregado). Para enfatizar a natureza vetorial do processo, a reação geral normalmente é escrita com subscritos que indicam a localização dos prótons: P para o lado positivo da membrana interna (o espaço intermembrana), N para o lado negativo (a matriz):

$$\text{NADH} + 5\,\text{H}^+_\text{N} + \text{Q} \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{QH}_2 + 4\,\text{H}^+_\text{P} \qquad (19\text{-}2)$$

Amital (fármaco do tipo barbiturato), rotenona (produto vegetal comumente utilizado como inseticida) e piericidina A (antibiótico) inibem o fluxo de elétrons dos centros de ferro-enxofre do complexo I para a ubiquinona (Tabela 19-4) e, portanto, bloqueiam o processo global da fosforilação oxidativa.

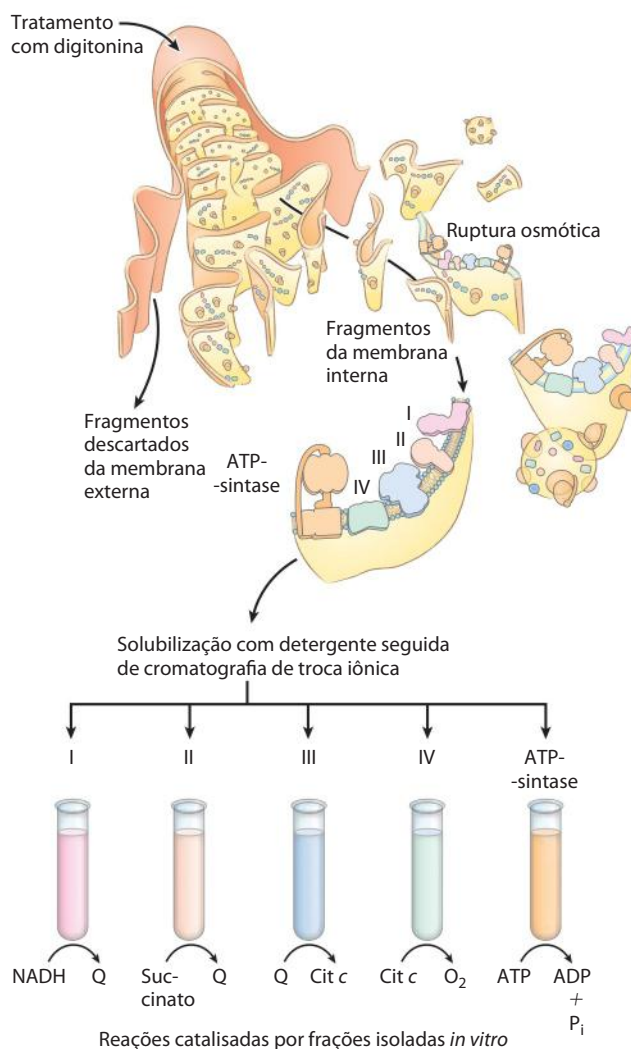



**FIGURA 19-7 Separação dos complexos funcionais da cadeia respiratória.** Inicialmente, a membrana mitocondrial externa é removida por tratamento com o detergente digitonina. Fragmentos da membrana interna são então obtidos por ruptura osmótica das mitocôndrias, e os fragmentos são suavemente dissolvidos em um segundo detergente. A mistura resultante de proteínas da membrana interna é separada por cromatografia de troca iônica em diferentes complexos (de I a IV) da cadeia respiratória, cada um com sua composição proteica singular (ver Tabela 19-3), e a enzima ATP-sintase (algumas vezes chamada de complexo V). Os complexos isolados de I a IV catalisam transferências entres doadores (NADH e succinato), carregadores intermediários (Q e citocromo *c*) e $O_2$, conforme representado. *In vitro*, a ATP-sintase isolada tem apenas atividade de hidrólise de ATP (ATPase) e não de síntese de ATP.

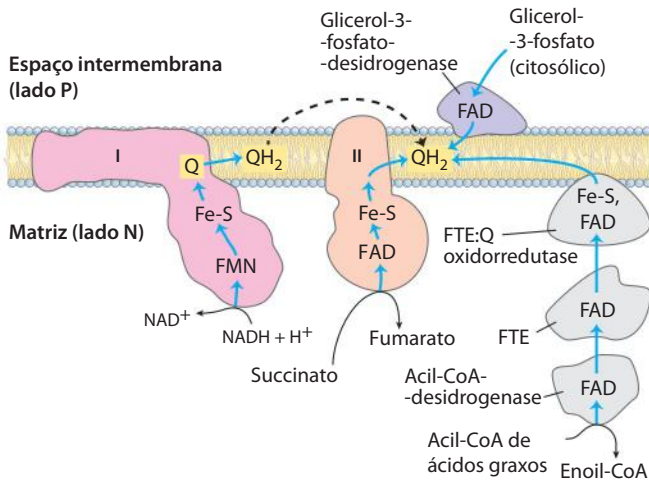



**FIGURA 19-8 Via dos elétrons de NADH, succinato, acil-CoA de ácidos graxos e glicerol-3-fosfato para a ubiquinona.** Ubiquinona (Q) é o ponto de entrada para os elétrons derivados das reações do citosol, a partir de reações de oxidação dos ácidos graxos e da oxidação do succinato (no ciclo do ácido cítrico). Os elétrons do NADH passam por uma flavoproteína com o cofator FMN e para uma série de centros Fe-S (no complexo I) e, então, para Q. Os elétrons do succinato passam por uma flavoproteína com o cofator FAD e de vários centros Fe-S (no complexo II) a caminho de Q. O glicerol-3--fosfato doa elétrons a uma flavoproteína (glicerol-3-fosfato-desidrogenase) na face externa da membrana mitocondrial interna, de onde eles passam para Q. A acil-CoA-desidrogenase (a primeira enzima da $\beta$-oxidação) transfere elétrons à flavoproteína transferidora de elétrons (FTE), de onde eles passam a Q por meio da FTE:ubiquinona-oxidorredutase.

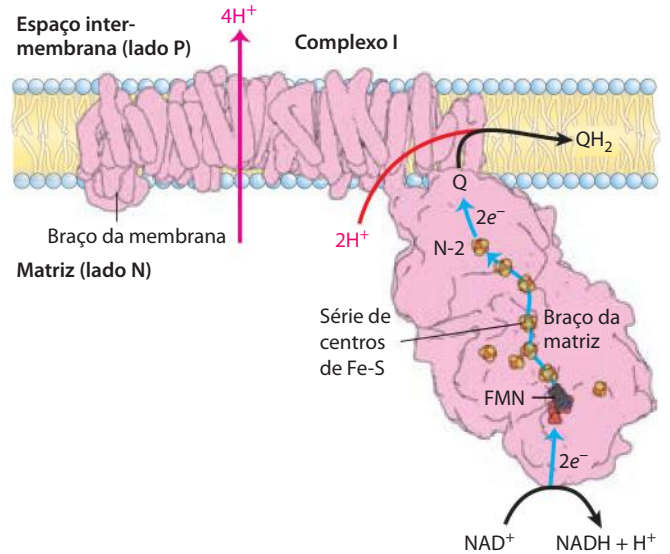



**FIGURA 19-9 NADH:ubiquinona-oxidorredutase (complexo I).** (PDB ID 3M9S) O complexo I (a estrutura cristalina da bactéria *Thermus thermophilus* é mostrada) catalisa a transferência de um íon hidreto de NADH a FMN, de onde dois elétrons passam por uma série de centros de Fe-S para o centro Fe-S N-2 no braço da matriz do complexo. A transferência de elétrons de N-2 para a ubiquinona no braço da membrana forma $QH_2$, que se difunde na bicamada lipídica. Esta transferência de elétrons também governa a expulsão da matriz de quatro prótons por par de elétrons. O mecanismo detalhado que acopla a transferência de elétrons e prótons no complexo I ainda não é conhecido, mas provavelmente envolve um ciclo Q similar ao do complexo III, onde $QH_2$ participa duas vezes para cada par de elétrons (ver Figura 19-12). O fluxo de prótons produz um potencial eletroquímico através da membrana mitocondrial interna (lado N negativo, lado P positivo).

**TABELA 19-4** Agentes que interferem com a fosforilação oxidativa ou com a fotofosforilação

| Tipo de interferência | Composto* | Alvo/modo de ação |
|---|---|---|
| Inibição da transferência de elétrons | Cianeto<br>Monóxido de carbono | Inibem a citocromo-oxidase |
| | Antimicina A | Bloqueia a transferência de elétrons do citocromo *b* ao citocromo $c_1$ |
| | Mixotiazol<br>Rotenona<br>Amital<br>Piericidina A | Impedem a transferência de elétrons do centro Fe-S à ubiquinona |
| | DCMU | Compete com $Q_B$ pelo sítio de ligação do PSII |
| Inibição da ATP-sintase | Aurovertina | Inibe $F_1$ |
| | Oligomicina<br>Venturicidina | Inibem $F_o$ e $CF_o$ |
| | DCCD | Bloqueia o fluxo de prótons por $F_o$ e $CF_o$ |
| Desacoplamento da fosforilação da transferência de elétrons | FCCP<br>DNP | Carregadores hidrofóbicos de prótons |
| | Valinomicina | Ionóforo $K^+$ |
| | Termogenina | Em tecido adiposo marrom, forma poros condutores de prótons na membrana mitocondrial interna |
| Inibição da troca ATP-ADP | Atractilosídeo | Inibe a adenina-nucleotídeo-translocase |

*DCMU é 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilureia; DCCD, diciclo-hexilcarbodiimida; FCCP, cianeto-*p*-trifluorometoxifenil-hidrazona; DNP, 2,4-dinitrofenol.

**Complexo II: succinato a ubiquinona.** O **complexo II** foi apresentado no Capítulo 16 como **succinato-desidrogenase**, a única enzima do ciclo do ácido cítrico ligada à membrana (p. 646). Embora menor e mais simples do que o complexo I, ele contém cinco grupos prostéticos de dois tipos e quatro subunidades proteicas diferentes (**Figura 19-10**). As subunidades C e D são proteínas integrais de membrana, cada uma com três hélices transmembrana. Elas contêm um grupo heme, heme *b*, e um sítio de ligação para a ubiquinona, o aceptor final de elétrons na reação catalisada pelo complexo II. As subunidades A e B se estendem para a matriz; elas contêm três centros 2Fe-2S, FAD ligado e um sítio de ligação para o substrato, o succinato. A via de transferência de elétrons do sítio de ligação do succinato a FAD e, então, pelos centros Fe-S rumo ao sítio de ligação de Q, tem mais de 40 Å de comprimento, mas nenhuma das distâncias individuais de transferência de elétrons excede cerca de 11 Å – distância razoável para uma transferência rápida de elétrons (Figura 19-10).

O heme *b* do complexo II aparentemente não está na via direta de transferência de elétrons; em vez disso, pode servir para reduzir a frequência com que elétrons "vazam" para fora do sistema, movendo-se do succinato ao oxigênio molecular para produzir as **espécies reativas de oxigênio** (**ERO**) peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$) e o **radical superóxido** ($^{\bullet}O_2^-$), conforme descrito a seguir. Humanos com mutações pontuais nas subunidades do complexo II perto do heme *b* ou do sítio de ligação da quinona sofrem de paraganglioma hereditário. Essa condição hereditária é caracterizada por tumores benignos da cabeça e do pescoço, comumente no corpo carotídeo, órgão que percebe os níveis de $O_2$ no sangue. Essas mutações resultam em maior produção das ERO e talvez maior dano ao tecido durante a oxidação do succinato. ■

**FIGURA 19-10 Estrutura do complexo II (succinato-desidrogenase).** (PDB ID 1ZOY) Este complexo (aqui está apresentada a enzima do coração de porco) tem duas subunidades transmembrana, C e D: as extensões citoplasmáticas contêm as subunidades A e B. Logo atrás de FAD na subunidade A está o sítio de ligação do succinato. A subunidade B tem três conjuntos de centros de Fe-S; ubiquinona é ligada à subunidade B; um heme *b* está localizado entre as subunidade C e D. Duas moléculas de fosfatidiletanolamina estão tão fortemente ligadas à subunidade D que aparecem na estrutura cristalina. Os elétrons se movem (setas azuis) do succinato ao FAD e, então, através de três centros de Fe-S, para a ubiquinona. O heme *b* não está na via principal da transferência de elétrons, mas protege contra a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) por elétrons que saem da via.

Outros substratos das desidrogenases mitocondriais passam elétrons para a cadeia respiratória no nível da ubiquinona, mas não pelo complexo II. O primeiro passo na $\beta$-oxidação da acil-CoA dos ácidos graxos, catalisada pela flavoproteína **acil-CoA-desidrogenase** (ver Figura 17-8), envolve a transferência de elétrons do substrato para o FAD da desidrogenase e, então, para a flavoproteína transferidora de elétrons (FTE), que, por sua vez, passa seus elétrons a **FTE:ubiquinona-oxidorredutase** (Figura 19-8). Essa enzima transfere elétrons para a cadeia respiratória reduzindo a ubiquinona. O glicerol-3-fosfato, formado a partir do glicerol liberado pela quebra do triacilglicerol ou pela redução da di-hidroxiacetona-fosfato da glicólise, é oxidado pela **glicerol-3-fosfato-desidrogenase** (ver Figura 17-4). Essa enzima é uma flavoproteína localizada na face externa da membrana mitocondrial interna e, como a succinato-desidrogenase e a acil-CoA-desidrogenase, ela canaliza elétrons para a cadeia respiratória reduzindo ubiquinona (Figura 19-8). O importante papel da glicerol-3-fosfato-desidrogenase em lançar equivalentes redutores do NADH citosólico para a matriz mitocondrial é descrito na Seção 19.2 (ver Figura 19-32). O efeito de cada uma dessas enzimas transferidoras de elétrons é contribuir para o conjunto (*pool*) de ubiquinona reduzida. O $QH_2$ de todas essas reações é reoxidado pelo complexo III.

**Complexo III: ubiquinona para citocromo c.** O próximo complexo respiratório, o **complexo III**, também chamado de **complexo de citocromo $bc_1$** ou **ubiquinona: citocromo *c*-oxidorredutase**, acopla a transferência de elétrons do ubiquinol ($QH_2$) para o citocromo *c* com o transporte vetorial de prótons da matriz para o espaço intermembrana. As determinações da estrutura completa desse enorme complexo (**Figura 19-11**) e do complexo IV (a seguir) por cristalografia por raios X, realizada entre 1995 e 1998, foram marcos no estudo da transferência mitocondrial de elétrons, fornecendo a base estrutural para integrar as diversas observações bioquímicas das funções dos complexos respiratórios.

A unidade funcional do complexo III é um dímero, com as duas unidades monoméricas de citocromo *b* circundando uma "caverna" no meio da membrana, na qual a ubiquinona fica livre para se mover do lado da matriz da membrana (sítio $Q_N$ em um monômero) para o espaço intermembrana (sítio $Q_P$ do outro monômero), à medida que ela lança elétrons e prótons através da membrana mitocondrial interna (Figura 19-11b).

Com base na estrutura do complexo III e em estudos bioquímicos detalhados das reações redox, um modelo razoável, **o ciclo Q**, foi proposto para a passagem de elétrons

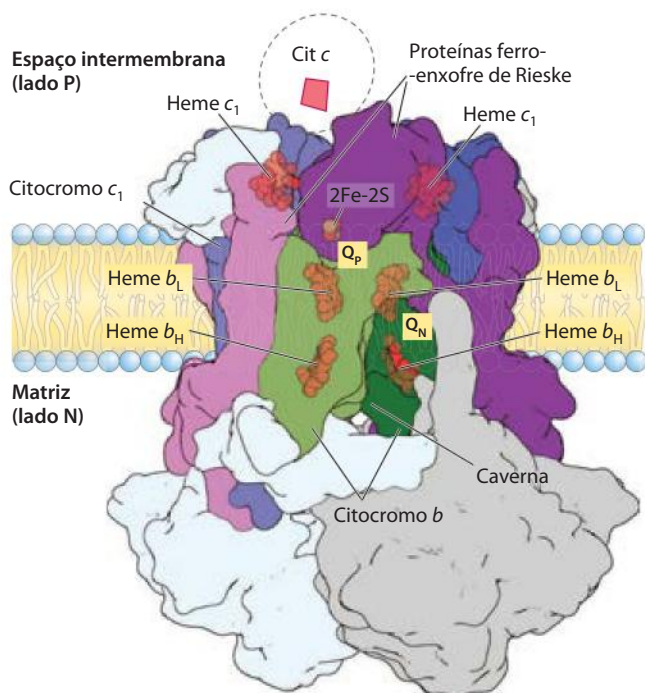
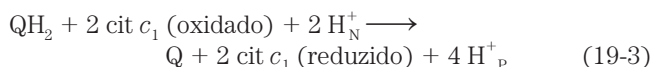



**FIGURA 19-11 Complexo de citocromo $bc_1$ (complexo III).** (PDB ID 1BGY). O complexo é um dímero de monômeros idênticos, cada um com 11 subunidades diferentes. O centro funcional de cada monômero é constituído por três subunidades: citocromo *b* (em verde) com seus dois hemes ($b_H$ e $b_L$); a proteína ferro-enxofre de Rieske (em púrpura) com seus dois centros de 2Fe-2S; e o citocromo $c_1$ (em azul) com seu heme. Este desenho do complexo mostra como o citocromo $c_1$ e a proteína ferro-enxofre de Rieske projetam-se da superfície P e podem interagir com o citocromo *c* (que não faz parte do complexo funcional) no espaço intermembrana. O complexo tem dois sítios de ligação distintos para ubiquinona, $Q_N$ e $Q_P$, que correspondem aos sítios de inibição por dois fármacos que bloqueiam a fosforilação oxidativa. Antimicina A, que bloqueia o fluxo de elétrons do heme $b_H$ para Q, liga-se a $Q_N$, perto do heme $b_H$ no lado N (matriz) da membrana. Mixotiazol, que impede o fluxo de elétrons de $QH_2$ para a proteína ferro-enxofre de Rieske, liga-se a Q perto do centro de 2Fe-2S e ao heme $b_L$ no lado P. A estrutura dimérica é essencial para o funcionamento do complexo III. A interface entre os monômeros forma duas cavernas, cada uma contendo um sítio $Q_P$ de um monômero e um sítio $Q_N$ do outro. Os intermediários da ubiquinona movimentam-se dentro dessas cavernas protegidas.

O complexo III cristaliza-se em duas conformações distintas (não mostradas). Em uma, o centro de Fe-S de Rieske está próximo ao seu aceptor de elétrons, o heme do citocromo $c_1$, mas relativamente distante do citocromo *b* e do sítio de ligação de $QH_2$, no qual centro de Fe-S de Rieske recebe elétrons. Na outra, o centro de Fe-S se afastou do citocromo $c_1$ e se aproximou do citocromo *b*. Acredita-se que a proteína de Rieske oscile entre essas duas conformações, à medida que é primeiramente reduzida e depois oxidada.

e prótons pelo complexo. A equação resultante para as reações redox do ciclo Q (**Figura 19-12**) é

$$QH_2 + 2 \text{ cit } c_1 \text{ (oxidado)} + 2\,H^+_N \longrightarrow Q + 2 \text{ cit } c_1 \text{ (reduzido)} + 4\,H^+_P \qquad (19\text{-}3)$$

O ciclo Q acomoda a troca entre o carregador de dois elétrons ubiquinol (a forma reduzida da ubiquinona) e os carregadores de um elétron – hemes $b_L$ e $b_H$ do citocromo *b* e citocromos $c_1$ e *c* – e resulta na absorção de dois prótons no lado N e a liberação de quatro prótons no lado P por par de elétrons que passa para o citocromo *c* pelo complexo III. Dois dos prótons liberados no lado P são eletrogênicos; os outros dois são eletroneutros, balanceados pelas duas cargas (elétrons) passadas ao citocromo *c* no lado P. Embora a via de elétrons por esse segmento da cadeia respiratória seja complicada, o efeito resultante da transferência é simples: $QH_2$ é oxidado a Q, duas moléculas de citocromo *c* são reduzidas, e prótons são movidos do lado P para o lado N.

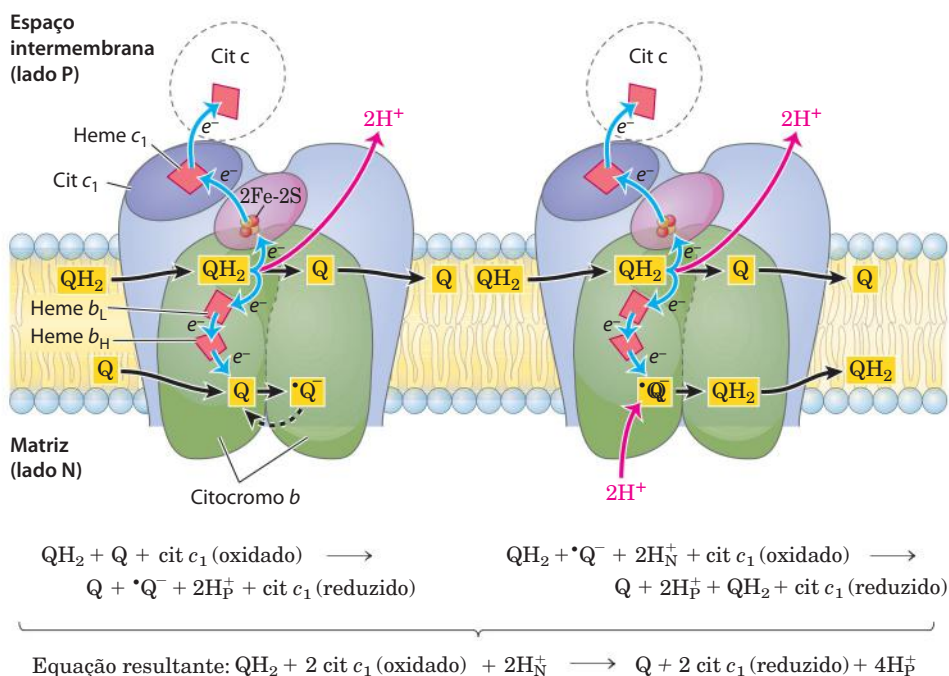



**FIGURA 19-12 O ciclo Q apresentado em dois estágios.** A via de elétrons pelo complexo III é mostrada por setas azuis. O movimento de várias formas de ubiquinona é ilustrado com setas pretas. No primeiro estágio (à esquerda), Q no lado N é reduzida ao radical semiquinona, que retorna à sua posição para aceitar outro elétron. No segundo estágio (à direita), o radical semiquinona é convertido a $QH_2$. Enquanto isto, no lado P da membrana, duas moléculas de $QH_2$ são oxidadas a Q, liberando dois prótons por molécula de Q (quatro prótons ao todo) para o espaço intermembrana. Cada $QH_2$ doa um elétron (por meio do centro de Fe-S de Rieske) para o citocromo $c_1$ e um elétron (via citocromo *b*) para a molécula de Q próxima ao lado N, reduzindo-a em duas etapas a $QH_2$. Esta redução também consome dois prótons por molécula de Q, os quais são retirados da matriz (lado N). O cit *c*1 passa um elétron por vez ao cit *c*, que se dissocia e carrega elétrons ao complexo IV.

O citocromo *c* é uma proteína solúvel do espaço intermembrana. Depois que seu único heme aceita um elétron do complexo III, o citocromo *c* move-se para o complexo IV para doar o elétron para um centro de cobre binuclear.

**Complexo IV: citocromo *c* para $O_2$.** Na etapa final da cadeia respiratória, o **complexo IV**, também chamado de **citocromo-oxidase**, carrega elétrons do citocromo *c* para o oxigênio molecular, reduzindo-o a $H_2O$. O complexo IV é uma enzima grande (13 subunidades; $M_r$ 204.000) da membrana mitocondrial interna. As bactérias contêm uma forma bem mais simples, com apenas três ou quatro subunidades, mas ainda capaz de catalisar tanto a transferência de elétrons quanto o bombeamento de prótons. A comparação dos complexos mitocondrial e bacteriano sugere que três subunidades são essenciais para a função (**Figura 19-13**).

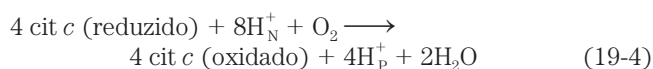
A subunidade II mitocondrial contém dois íons cobre complexados com os grupos —SH de dois resíduos de Cys em um centro binuclear ($Cu_A$; Figura 19-13b) que lembra os centros de 2Fe-2S das proteínas ferro-enxofre. A subunidade I contém dois grupos heme, designados $a$ e $a_3$, e um outro íon cobre ($Cu_B$). Heme $a_3$ e $Cu_B$ formam um segundo centro binuclear que aceita elétrons de heme $a$ e os transfere ao $O_2$ ligado ao heme $a_3$.

A transferência de elétrons pelo complexo IV dá-se do citocromo *c* para o centro de $Cu_A$, para o heme $a$, para o centro de heme $a_3$-$Cu_B$ e, finalmente, para o $O_2$ (**Figura 19-14**). Para cada quatro elétrons que passam por complexo, a enzima consome quatro "substratos" $H^+$ da matriz (lado N) na conversão de $O_2$ a $2H_2O$. Ela também usa a energia dessa reação redox para bombear um próton para fora em direção ao espaço intermembrana (lado P) para cada elétron que

**FIGURA 19-13 Estrutura da citocromo-oxidase (complexo IV).** Este complexo de mitocôndrias bovinas tem 13 subunidades, mas apenas quatro proteínas centrais são mostradas aqui (PDB ID 1OCC). **(a)** Complexo IV, com quatro subunidades em cada uma das duas unidades idênticas de um dímero. A subunidade I (em amarelo) tem dois grupos heme, $a$ e $a_3$, perto de um único íon cobre, $Cu_B$ (não visível aqui). Heme $a_3$ e $Cu_B$ formam um centro binuclear Fe-Cu. A subunidade II (em púrpura) contém dois íons Cu complexados com os grupos –SH de dois resíduos de Cys em um centro binuclear, $Cu_A$, que lembra os centros de 2Fe-2S das proteínas ferro-enxofre. O centro binuclear e o sítio de ligação ao citocromo *c* estão localizados em um domínio da subunidade II que se projeta do lado P da membrana interna (para o espaço intermembrana). A subunidade III (em azul-claro) é essencial para o rápido movimento de prótons pela subunidade II. O papel da subunidade IV (em verde) ainda não é conhecido. **(b)** Centro binuclear de $Cu_A$. Os íons Cu partilham elétrons igualmente. Quando o centro está reduzido, os íons têm as cargas formais $Cu^{1+}Cu^{1+}$; quando oxidado, $Cu^{1,5+}Cu^{1,5+}$. Seis resíduos de aminoácidos são ligantes ao redor dos íons Cu: dois de His, dois de Cys, Glu e Met.

**FIGURA 19-14 Via dos elétrons pelo complexo IV.** As três proteínas cruciais para o fluxo de elétrons são as subunidades I, II e III. A estrutura maior em verde inclui outras 10 proteínas do complexo. A transferência de elétrons pelo complexo IV inicia com o citocromo *c* (parte superior). Duas moléculas de citocromo *c* reduzido doam, cada uma, um elétron para o centro binuclear $Cu_A$. Deste, os elétrons passam pelo heme $a$ para o centro de Fe-Cu (citocromo $a_3$ e $Cu_B$). O oxigênio agora se liga ao heme $a_3$ e é reduzido a seu derivado peróxido ($O_2^{2-}$, não mostrado aqui) por dois elétrons do centro de Fe-Cu. A chegada de mais dois elétrons a partir do citocromo *c* (parte superior, perfazendo quatro elétrons ao todo) converte o $O_2^{2-}$ em duas moléculas de água, com o consumo de quatro prótons ("substrato") da matriz. Ao mesmo tempo, quatro prótons são bombeados da matriz por um mecanismo ainda indeterminado.

passa, contribuindo para o potencial eletroquímico produzido pelo transporte de prótons possibilitado pela energia dessas reações redox pelos complexos I e III. A reação geral catalisada pelo complexo IV é

$$4 \text{ cit } c \text{ (reduzido)} + 8H^+_N + O_2 \longrightarrow 4 \text{ cit } c \text{ (oxidado)} + 4H^+_P + 2H_2O \qquad (19\text{-}4)$$

Esta redução do $O_2$ por quatro elétrons envolve centros redox que carregam apenas um elétron por vez, e ela deve ocorrer sem a liberação de intermediários que não são completamente reduzidos, como peróxido de hidrogênio ou radicais livres hidroxila – espécies muito reativas que danificariam os componentes celulares. Os intermediários permanecem fortemente ligados ao complexo, até serem completamente convertidos em água.

## Os complexos mitocondriais podem se associar em respirassomos

Existe evidência experimental crescente de que, nas mitocôndrias intactas, os complexos respiratórios se associam firmemente uns com os outros na membrana interna para formar **respirassomos**, combinações funcionais de dois ou mais complexos de transferência de elétrons diferentes. Por exemplo, quando o complexo III é gentilmente extraído das membranas mitocondriais, verifica-se que ele está associado com o complexo I e permanece associado durante eletroforese leve. Supercomplexos do complexo III e IV também podem ser isolados e, quando vistos por microscopia eletrônica, têm o tamanho e a forma certos para acomodar as estruturas cristalinas de ambos os complexos (**Figura 19-15**). Proteínas de uma família sintetizadas sob o controle do fator hipoxia-induzível FHI são encontradas associadas aos respirassomos e podem ser essenciais à sua formação e estabilidade. O FHI media mudanças na composição do complexo IV sob condições hipóxicas (Figura 19-34). A cinética do fluxo de elétrons pela série de complexos respiratórios seria muito diferente nos dois casos extremos de firme associação *versus* não associação: (1) se os complexos fossem firmemente associados, as transferências de elétrons ocorreriam essencialmente através de um estado sólido; e (2) se os complexos funcionassem separadamente, os elétrons seriam carregados entre eles pela ubiquinona e o citocromo $c$. A evidência cinética sustenta a transferência de elétrons através de um estado sólido e, portanto, o modelo do respirassomo.

A cardiolipina, o lipídeo especialmente abundante na membrana mitocondrial interna (ver Figuras 10-9 e 11-2), pode ser essencial para a integridade dos respirassomos; sua remoção com detergentes ou sua ausência em certos mutantes de leveduras resulta em transferência anormal de elétrons e em uma perda de afinidade entre os complexos respiratórios.

## A energia da transferência de elétrons é eficazmente conservada em um gradiente de prótons

A transferência de dois elétrons do NADH, por meio da cadeia respiratória, para o oxigênio molecular pode ser escrita como

$$\text{NADH} + H^+ + \tfrac{1}{2}O_2 \longrightarrow \text{NAD}^+ + H_2O \qquad (19\text{-}5)$$

(a)

(b)

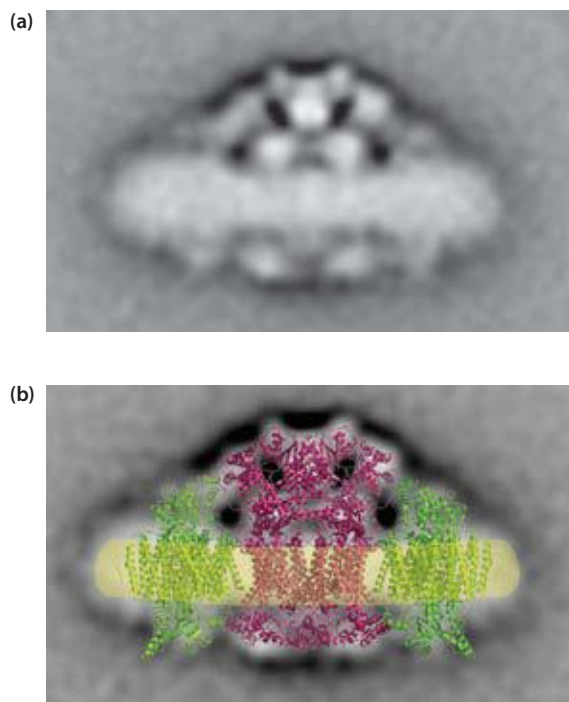
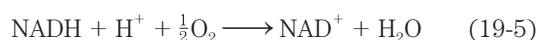



**FIGURA 19-15 Um suposto respirassomo composto por complexos III e IV. (a)** Supercomplexos purificados contendo complexos III e IV de levedura, visualizados por microscopia eletrônica depois de corados com acetato de uranila. As densidades eletrônicas de centenas de imagens foram utilizadas para compor esta visualização média. **(b)** As estruturas por raios X de uma molécula do complexo III (em vermelho; de leveduras) e de duas do complexo IV (em verde; de coração bovino) puderam ser ajustadas ao mapa de densidade eletrônica para sugerir um possível modo de interação destes complexos em um respirassomo. Esta visualização está no plano da bicamada (em amarelo).

Esta reação resultante é altamente exergônica. Para o par redox NAD$^+$/NADH, $E'^\circ$ é $-0{,}320$ V, e, para o par $O_2/H_2O$, $E'^\circ$ é 0,816 V. O $\Delta E'^\circ$ para esta reação é, portanto, 1,14 V, e a variação na energia livre padrão (ver Equação 13-7, p. 531) é

$$\begin{aligned} \Delta G'^\circ &= -n\mathcal{F}\Delta E'^\circ \qquad (19\text{-}6) \\ &= -2(96{,}5 \text{ kJ/V} \cdot \text{mol})(1{,}14 \text{ V}) \\ &= -220 \text{ kJ/mol (de NADH)} \end{aligned}$$

Esta variação na energia livre *padrão* tem como base a pressuposição de concentrações iguais (1 M) de NADH e de NAD$^+$. Em mitocôndrias que respiram ativamente, as ações de muitas desidrogenases mantêm a razão [NADH]/[NAD$^+$] real bem acima da unidade, e a variação real da energia livre para a reação mostrada na Equação 19-5 é, portanto, substancialmente maior (mais negativa) do que $-220$ kJ/mol. Um cálculo similar para a oxidação do succinato mostra que a transferência de elétrons do succinato ($E'^\circ$ para fumarato/succinato = 0,031 V) para o $O_2$ tem uma variação na energia livre padrão menor, mas ainda negativa, de cerca de $-150$ kJ/mol.

A maior parte dessa energia é usada para bombear prótons para fora da matriz. Para cada par de elétrons transferido para o $O_2$, quatro prótons são bombeados para fora pelo complexo I, quatro pelo complexo III e dois pelo com-

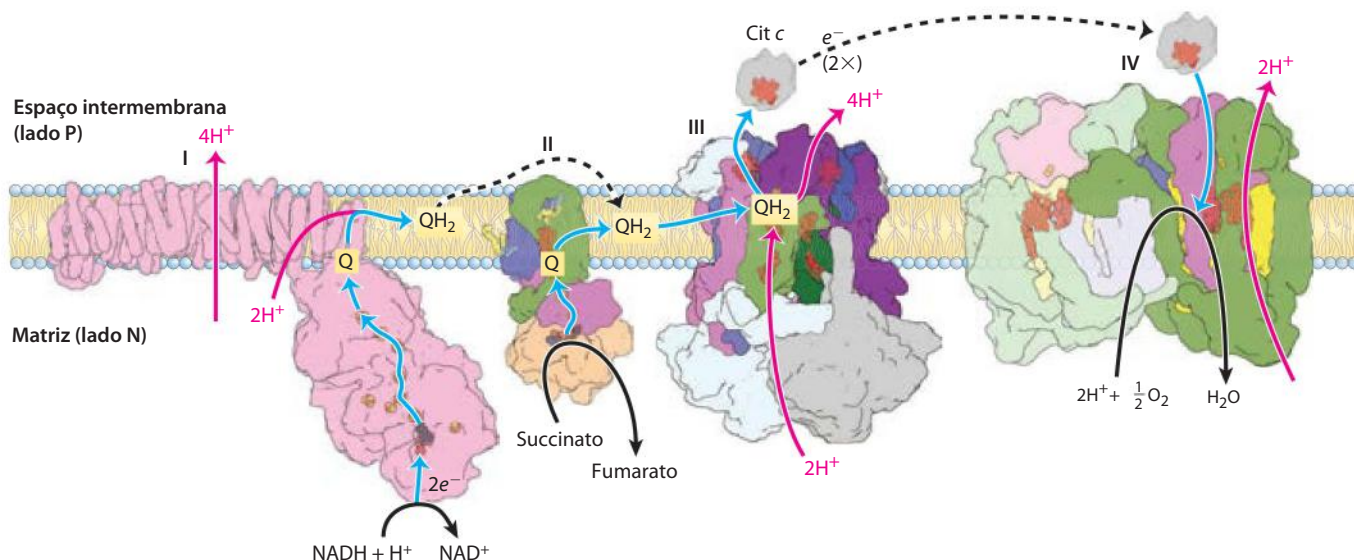



**FIGURA 19-16 Resumo do fluxo de elétrons e prótons pelos quatro complexos da cadeia respiratória.** Os elétrons chegam à Q por meio dos complexos I e II. A Q reduzida ($QH_2$) serve como carregador móvel de elétrons e prótons. Ela passa elétrons ao complexo III, que os passa a outro elemento móvel de ligação, o citocromo *c*. O complexo IV então transfere elétrons do citocromo *c* reduzido ao $O_2$. O fluxo de elétrons pelos complexos I, III e IV é acompanhado pelo fluxo de prótons da matriz ao espaço intermembrana. Lembre-se de que os elétrons da $\beta$-oxidação de ácidos graxos também podem entrar na cadeia respiratória por meio de Q (ver Figura 19-8). As estruturas mostradas aqui são de várias fontes: complexo I, *Thermus thermophilus* (PDB ID 3M95); complexo II, coração porcino (PDB ID 1ZOY); complexo III, coração bovino (PDB ID 1BGY); citocromo *c*, coração equino (PDB ID 1HRC); complexo IV, coração bovino (PDB ID 1OCC).

plexo IV (**Figura 19-16**). A equação *vetorial* para o processo é, portanto,

$$\text{NADH} + 11\text{H}^+_\text{N} + \tfrac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{NAD}^+ + 10\text{H}^+_\text{P} + \text{H}_2\text{O} \qquad (19\text{-}7)$$

A energia eletroquímica inerente a essa diferença na concentração de prótons e separação de cargas representa uma conservação temporária de grande parte da energia da transferência de elétrons. A energia estocada nesse gradiente, chamada de **força próton-motriz**, tem dois componentes: (1) a *energia potencial química*, devido à diferença de concentração de uma espécie química ($H^+$) nas duas regiões separadas pela membrana; e (2) a *energia potencial elétrica*, que resulta da separação de cargas quando um próton se move através da membrana sem um contra-íon (**Figura 19-17**).

Conforme foi mostrado no Capítulo 11, a variação de energia livre para a criação de um gradiente eletroquímico por uma bomba de íons é

$$\Delta G = RT \ln (C_2/C_1) + Z\mathcal{F}\Delta\psi \qquad (19\text{-}8)$$

onde $C_2$ e $C_1$ são as concentrações de um íon em duas regiões, e $C_2 > C_1$; $Z$ é o valor absoluto de sua carga elétrica (1 para um próton); e $\Delta\psi$ é a diferença transmembrana no potencial elétrico, medida em volts.

Para prótons a 25°C,

$$\begin{aligned}\ln (C_2/C_1) &= 2{,}3(\log\,[\text{H}^+]_\text{P} - \log\,[\text{H}^+]_\text{N}) \\ &= 2{,}3(\text{pH}_\text{N} - \text{pH}_\text{P}) = 2{,}3\ \Delta\text{pH}\end{aligned}$$

e a Equação 19-8 se reduz a

$$\begin{aligned}\Delta G &= 2{,}3RT\ \Delta\text{pH} + \mathcal{F}\Delta\psi \qquad (19\text{-}9) \\ &= (5{,}70\ \text{kJ/mol})\ \Delta\text{pH} + (96{,}5\ \text{kJ/V}\cdot\text{mol})\ \Delta\psi\end{aligned}$$

Em mitocôndrias que respiram ativamente, o $\Delta\psi$ medido é de 0,15 a 0,20 V, e o pH da matriz é cerca de 0,75 unidade mais alcalino do que aquele do espaço intermembrana.

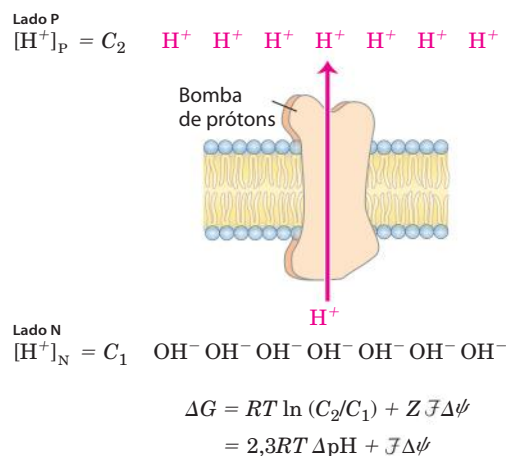



**FIGURA 19-17 Força próton-motriz.** A membrana mitocondrial interna separa dois compartimentos de diferentes [$H^+$], resultando em diferenças na concentração química ($\Delta$pH) e na distribuição de cargas ($\Delta\psi$) através da membrana. O efeito resultante é a força próton-motriz ($\Delta G$), que pode ser calculada como aqui apresentado. Isto é explicado de forma mais completa no texto.

**PROBLEMA RESOLVIDO 19-1 Energética da transferência de elétrons**

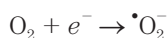
Calcule a quantidade de energia conservada no gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna por par de elétrons transferido através da cadeia respiratória do NADH ao oxigênio. Assuma que $\Delta\psi$ é de 0,15 V e a diferença de pH é de 0,75 unidade.

**Solução:** A Equação 19-9 fornece a mudança de energia livre quando *um* mol de prótons se move através da membrana interna. Substituindo os valores medidos para $\Delta$pH (0,75 unidades) e $\Delta\psi$ (0,15 V) nesta equação, encontra-se um $\Delta G$ = 19 kJ/mol (de prótons). Como a transferência de dois elétrons do NADH ao $O_2$ é acompanhada pelo bombeamento para fora de 10 prótons (Equação 19-7), aproximadamente 200 kJ (dos 220 kJ liberados pela oxidação de 1 mol de NADH) são conservados no gradiente de prótons.

Quando os prótons fluem espontaneamente a favor de seu gradiente eletroquímico, energia se faz disponível para realizar trabalho. Em mitocôndrias, cloroplastos e bactérias aeróbias, a energia eletroquímica do gradiente de prótons impulsiona a síntese de ATP a partir de ADP e $P_i$. Mais detalhes sobre energética e estequiometria da síntese de ATP propiciada pelo potencial eletroquímico do gradiente de prótons podem ser encontrados na Seção 19.2.

## Espécies reativas de oxigênio são geradas durante a fosforilação oxidativa

Diversas etapas na via de redução do oxigênio em mitocôndrias têm o potencial de produzir radicais livres altamente reativos, que podem danificar as células. A passagem de elétrons de $QH_2$ ao complexo III e a passagem de elétrons dos complexos I e II ao $QH_2$ envolvem o radical $^{\bullet}Q^-$ como intermediário. O $^{\bullet}Q^-$ pode, com baixa probabilidade, passar um elétron ao $O_2$ na reação

$$O_2 + e^- \rightarrow {}^{\bullet}O_2^-$$

O radical livre superóxido assim gerado é altamente reativo; sua formação também leva à produção do radical livre hidroxila, $^{\bullet}$OH, ainda mais reativo (**Figura 19-18**).

Espécies reativas de oxigênio podem provocar sérios danos, reagindo com enzimas, lipídeos de membranas e ácidos nucleicos e os danificando. Em mitocôndrias que respiram ativamente, de 0,1 até 4% do oxigênio utilizado na respiração formam $^{\bullet}O_2^-$ – mais do que suficiente para ter efeitos letais, a não ser que o radical livre seja rapidamente descartado. Fatores que diminuem a velocidade de fluxo de elétrons pela cadeia respiratória aumentam a formação de superóxido, talvez por prolongarem o tempo de vida do $^{\bullet}O_2^-$ gerado no ciclo Q. A formação de ERO é favorecida quando duas condições são satisfeitas: (a) as mitocôndrias não estão produzindo ATP (por falta de ADP ou de $O_2$) e, portanto, têm grande força próton-motriz e elevada razão $QH_2$/Q e (b) e há uma alta razão NADH/$NAD^+$ na matriz. Nessas situações, a mitocôndria está sob estresse oxidativo – há

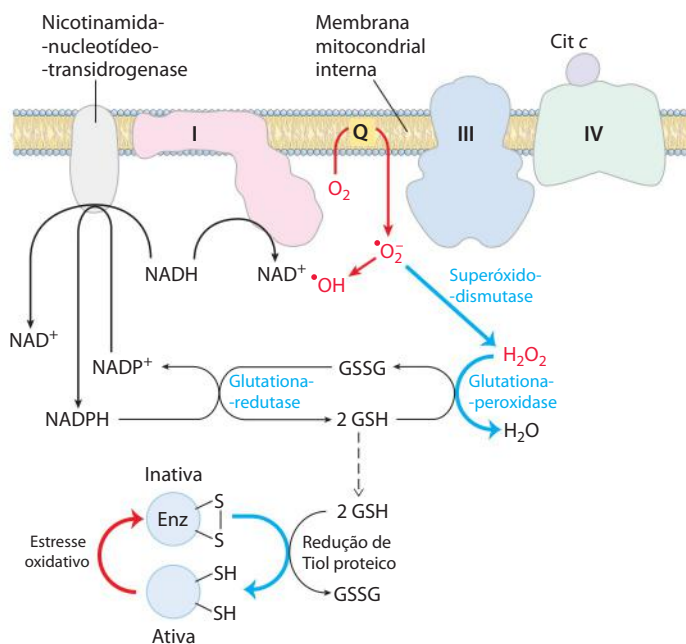
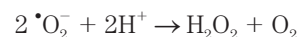



**FIGURA 19-18 Formação de ERO nas mitocôndrias e defesas mitocondriais.** Quando a taxa de entrada de elétrons na cadeia respiratória e a taxa de transferência de elétrons ao longo da cadeia não são coordenadas, a produção do radical superóxido ($^{\bullet}O_2^-$) aumenta nos complexos I e III à medida que o radical ubiquinona parcialmente reduzido ($^{\bullet}Q^-$) doa um elétron para o $O_2$. O superóxido atua sobre a aconitase, uma proteína 4Fe-4S, para liberar $Fe^{2+}$. Na presença de $Fe^{2+}$, a reação de Fenton leva à formação do radical livre hidroxila ($^{\bullet}$OH), fortemente reativo. As reações mostradas em azul defendem a célula contra os efeitos danosos do superóxido. A glutationa reduzida (GSH; ver Figura 22-29) doa elétrons para a redução de $H_2O_2$ e dos resíduos oxidados de Cys (–S–S–) de enzimas e outras proteínas, e GSH é regenerada a partir da forma oxidada (GSSG) por redução utilizando NADPH.

mais elétrons disponíveis para entrar na cadeia respiratória do que aquele número que pode imediatamente atravessar até o oxigênio. Quando o suprimento de doadores de elétrons (NADH) é equiparado àquele de aceptores de elétrons, existe menos estresse oxidativo e a produção de ERO é muito reduzida. Embora a superprodução de ERO seja obviamente prejudicial, *baixos* níveis de ERO podem ser usados pela célula como um sinal que reflete o suprimento insuficiente de oxigênio (hipoxia), desencadeando ajustes metabólicos (ver Figura 19-34).

Para impedir o dano oxidativo induzido pelo $^{\bullet}O_2^-$, as células têm diversas formas da enzima **superóxido-dismutase**, que catalisa a reação

$$2\,{}^{\bullet}O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

O peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$) assim gerado torna-se inofensivo pela ação da **glutationa-peroxidase** (Figura 19-18). A glutationa redutase recicla a glutationa oxidada em sua forma reduzida, usando elétrons do NADPH gerado pela nicotinamida-nucleotídeo-transidrogenase (na mitocôndria) ou pela via das pentoses-fosfato (no citosol;

**QUADRO 19-1**  **MEDICINA** **Plantas quentes e mal-cheirosas e vias respiratórias alternativas**

Muitas plantas com flor atraem insetos polinizadores liberando moléculas odoríferas que imitam as fontes naturais de alimento dos insetos ou os locais potenciais de oviposição. Plantas polinizadas por moscas ou besouros que normalmente se alimentam ou depositam seus ovos em esterco ou carniça algumas vezes usam compostos de odor desagradável para atrair esses insetos.

Uma família de plantas com odor desagradável é a Araceae, que inclui filodendros, antúrios e *Symplocarpus*. Essas plantas têm flores muito pequenas, densamente arranjadas em uma estrutura ereta, o espádice, circundado por uma folha modificada, a espata. O espádice libera odores de carne podre ou de esterco. Antes da polinização, o espádice também aquece, em algumas espécies chegando até 20 a 40°C acima da temperatura ambiente. A produção de calor (termogênese) ajuda a evaporar moléculas odoríferas para melhor dispersão e, como carne apodrecida e esterco normalmente são mornos devido ao mecanismo hiperativo de microrganismos saprofíticos, o calor por si só também pode atrair os insetos. No caso do *Symplocarpus* do leste (Figura Q-1), que floresce no fim do inverno ou no início da primavera, quando a neve ainda cobre o chão, a termogênese permite ao espádice crescer em meio à neve.

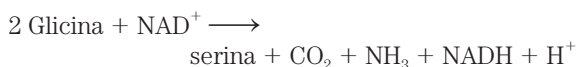
Como é que o *Symplocarpus* aquece o espádice? As mitocôndrias das plantas, dos fungos e dos eucariotos unicelulares têm sistemas de transferência de elétrons essencialmente iguais aos dos animais, mas também têm uma via respiratória alternativa. Uma $QH_2$-oxidase resistente ao cianeto transfere elétrons do *pool* de ubiquinona diretamente ao oxigênio, contornando as duas etapas translocadoras de prótons dos complexos III e IV (Figura Q-2). A energia que poderia ser conservada como ATP é, em vez disso, liberada como calor. As mitocôndrias vegetais também têm uma NADH-desidrogenase alternativa, insensível à rotenona, que inibe o complexo I (ver Tabela

**FIGURA Q-1** *Symplocarpus foetidus* do leste.

ver Figura 14-21). A glutationa reduzida também serve para manter os grupos sulfidril das proteínas em seu estado reduzido, impedindo alguns dos efeitos deletérios do estresse oxidativo (Figura 19-18). A nicotinamida-nucleotídeo-transidrogenase é crucial nesse processo: ela produz o NADPH, essencial para a atividade da glutationa-redutase.

## As mitocôndrias vegetais têm mecanismos alternativos para oxidar NADH

As mitocôndrias vegetais suprem a célula com ATP durante períodos de baixa iluminação ou escuridão por mecanismos completamente análogos àqueles usados por organismos não fotossintéticos. Na luz, a principal fonte de NADH mitocondrial é uma reação em que glicina, produzida por um processo conhecido como fotorrespiração, é convertida em serina (ver Figura 20-21):

$$2 \text{ Glicina} + NAD^+ \longrightarrow \text{serina} + CO_2 + NH_3 + NADH + H^+$$

Por razões discutidas no Capítulo 20, as plantas precisam realizar esta reação mesmo quando elas não precisam de NADH para a produção de ATP. Para regenerar $NAD^+$ a partir de NADH desnecessário, as mitocôndrias das plantas (e de alguns fungos e protistas) transferem elétrons do NADH diretamente à ubiquinona e da ubiquinona diretamente para o $O_2$, desviando dos complexos III e IV e suas bombas de prótons. Nesse processo, a energia do NADH é dissipada como calor, que algumas vezes pode ser de valor para a planta (Quadro 19-1). Ao contrário da citocromo-oxidase (complexo IV), a $QH_2$-oxidase alternativa não é inibida por cianeto. A oxidação de NADH resistente a cianeto é, portanto, o aspecto marcante dessa via singular de transferência de elétrons das plantas.

### RESUMO 19.1 Reações de transferência de elétrons em mitocôndrias

- A teoria quimiosmótica fornece o arcabouço intelectual para o entendimento de muitas transduções biológicas de energia, incluindo a fosforilação oxidativa e a fotofosforilação. O mecanismo de acoplamento energético é similar em ambos os casos: a energia do fluxo de elétrons é conservada pelo bombeamento concomitante de prótons através da membrana, produzindo um gradiente eletroquímico, a força próton-motriz.
- Em mitocôndrias, íons hidreto removidos de substratos (como $\alpha$-cetoglutarato e malato) por desidrogenases ligadas ao NAD doam elétrons para a cadeia respiratória (transportadora de elétrons), que transfere os elétrons para o $O_2$ molecular, reduzindo-o a $H_2O$.
- Equivalentes redutores do NADH são passados por uma série de centros de Fe-S até a ubiquinona, que transfe-

19-4). Essa desidrogenase transfere elétrons do NADH na matriz diretamente à ubiquinona, contornando o complexo I e o bombeamento de prótons a ele associado. As mitocôndrias vegetais têm ainda outra NADH-desidrogenase, na face externa da membrana interna, que transfere elétrons do NADPH ou do NADH no espaço intermembrana para a ubiquinona, novamente contornando o complexo I. Assim, quando os elétrons entram na via respiratória alternativa por meio da NADH-desidrogenase insensível à rotenona, da NADH-desidrogenase externa ou da succinato-desidrogenase (complexo II), e passam para o $O_2$ pela oxidase alternativa resistente ao cianeto, a energia não é conservada como ATP, mas é liberada como calor. Um *Symplocarpus* pode usar o calor para derreter a neve, produzir um cheiro fétido ou atrair besouros ou moscas.

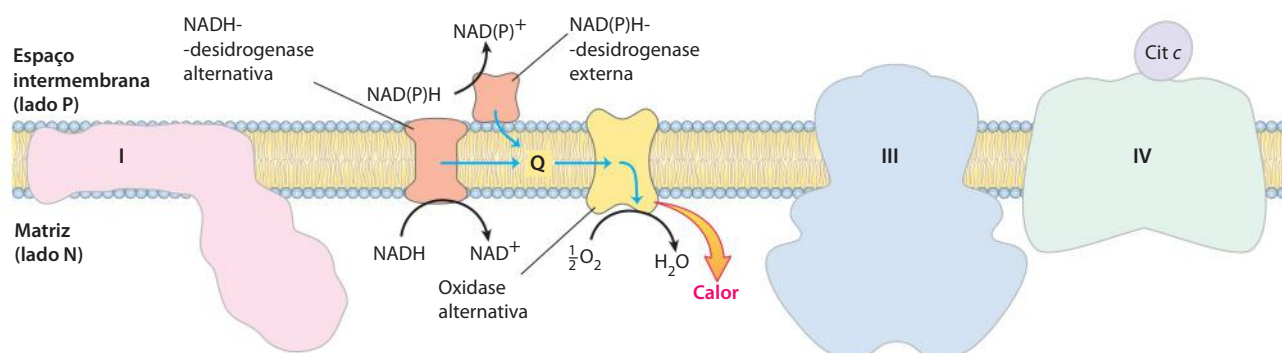



**FIGURA Q-2** Carregadores de elétrons da membrana interna de mitocôndrias vegetais. Os elétrons podem fluir pelos complexos I, III e IV, como nas mitocôndrias animais, ou por carregadores alternativos específicos das plantas, pelas vias mostradas pelas setas azuis.

re os elétrons ao citocromo *b*, o primeiro carregador do complexo III. Nesse complexo, os elétrons seguem duas vias separadas por meio de dois citocromos do tipo *b* e do citocromo $c_1$ para um centro de Fe-S. O centro de Fe-S passa elétrons, um de cada vez, pelo citocromo *c* para o complexo IV, a citocromo-oxidase. Essa enzima, que, além de conter cobre, também contém citocromos *a* e $a_3$, acumula elétrons e então os passa ao $O_2$, reduzindo-o a $H_2O$.

- Alguns elétrons entram nesta cadeia de carregadores por vias alternativas. O succinato é oxidado pela succinato-desidrogenase (complexo II), que contém uma flavoproteína que passa elétrons por vários centros de Fe-S até a ubiquinona. Elétrons derivados da oxidação de ácidos graxos passam para a ubiquinona por meio da flavoproteína transferidora de elétrons.
- Espécies reativas de oxigênio potencialmente danosas produzidas nas mitocôndrias são inativadas por um conjunto de enzimas protetoras, incluindo a superóxido-dismutase e a glutationa-peroxidase.
- Plantas, fungos e eucariotos unicelulares têm, além da via típica para a transferência de elétrons, sensível ao cianeto, uma via de oxidação de NADH alternativa, resistente ao cianeto.

## 19.2 Síntese de ATP

De que forma um gradiente de concentração de prótons se transforma em ATP? Foi visto que a transferência de elétrons libera e a força próton-motriz conserva energia livre mais do que suficiente (cerca de 200 kJ) por "mol" de par de elétrons para impulsionar a formação de um mol de ATP, que requer cerca de 50 kJ (p. 519). Portanto, a fosforilação oxidativa mitocondrial não impõe nenhum problema termodinâmico. Mas qual é o mecanismo químico que acopla o fluxo de prótons com a fosforilação?

O **modelo quimiosmótico**, proposto por Peter Mitchell, é o paradigma para esse mecanismo. De acordo com o modelo (**Figura 19-19**), a energia eletroquímica inerente à diferença de concentração de prótons e à separação de cargas através da membrana mitocondrial interna – a força próton-motriz – impulsiona a síntese de ATP, à medida que os prótons fluem passivamente de volta à matriz, por meio de um poro para prótons na **ATP-sintase**. Para enfatizar esse papel crucial da força próton-motriz, a equação para síntese de ATP é às vezes escrita

$$\text{ADP} + \text{P}_i + n\text{H}^+_P \longrightarrow \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} + n\text{H}^+_N \quad (19\text{-}10)$$

Mitchell usou o termo "quimiosmótico" para descrever reações enzimáticas que envolvem, simultaneamente, uma

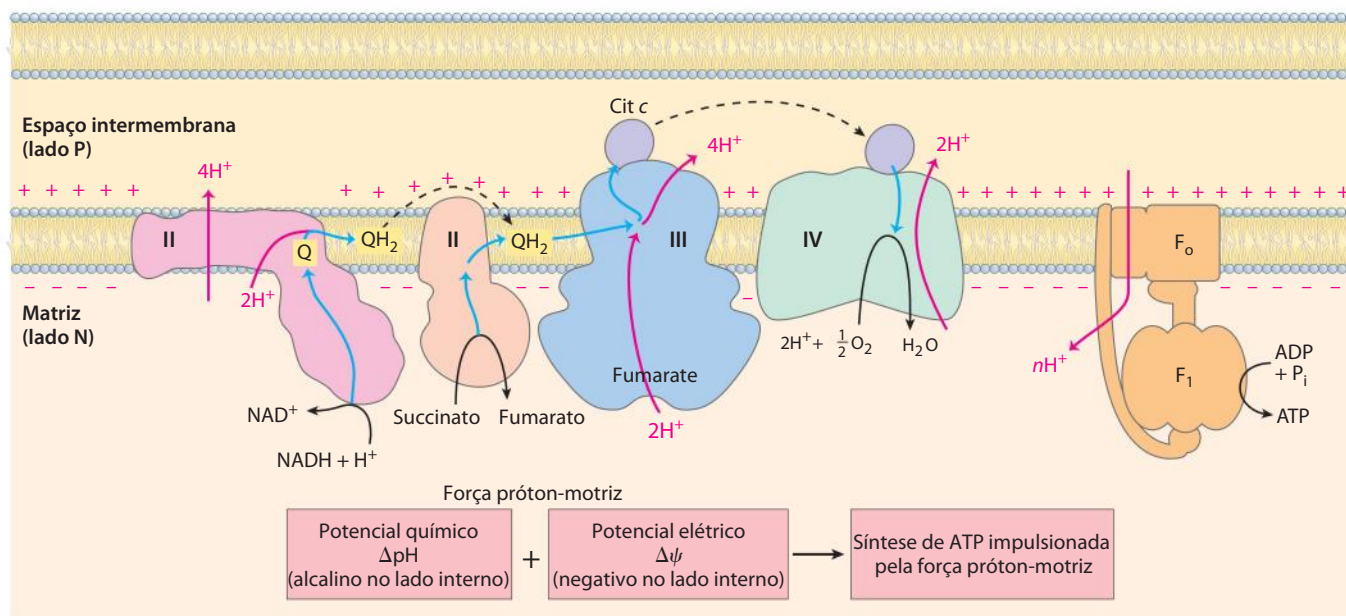
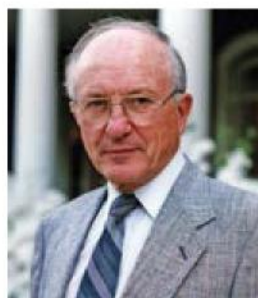



**FIGURA 19-19** **Modelo quimiosmótico.** Nesta simples representação da teoria quimiosmótica aplicada às mitocôndrias, os elétrons do NADH e de outros substratos oxidáveis passam por meio de uma cadeia de carregadores assimetricamente arranjados na membrana interna. O fluxo de elétrons é acompanhado pela transferência de prótons através da membrana, produzindo tanto um gradiente químico (ΔpH) quanto um gradiente elétrico (Δψ) (combinados, a força próton-motriz). A membrana mitocondrial interna é impermeável a prótons; os prótons só podem retornar à matriz através de canais específicos de prótons ($F_o$). A força próton-motriz que direciona os prótons de volta para a matriz proporciona a energia para a síntese de ATP, catalisada pelo complexo $F_1$, associado ao $F_o$.

Peter Mitchell, 1920–1992

reação química e um processo de transporte, e o processo global é muitas vezes denominado de "acoplamento químiosmótico". O acoplamento refere-se à conexão *obrigatória* entre a síntese mitocondrial de ATP e o fluxo de elétrons pela cadeia respiratória; nenhum dos dois processos pode prosseguir sem o outro. A definição operacional de acoplamento é mostrada na **Figura 19-20**. Quando mitocôndrias isoladas são suspensas em um tampão contendo ADP, $P_i$ e um substrato oxidável como succinato, três processos facilmente mensuráveis ocorrem: (1) o substrato é oxidado (succinato produz fumarato), (2) $O_2$ é consumido e (3) ATP é sintetizado. O consumo de oxigênio e a síntese de ATP dependem da presença de um substrato oxidável (nesse caso, o succinato), assim como de ADP e $P_i$.

Uma vez que a energia da oxidação de substratos permite a síntese de ATP nas mitocôndrias, seria esperado que os inibidores da passagem de elétrons para o $O_2$ (como cianeto, monóxido de carbono e antimicina A) bloqueassem a síntese de ATP (Figura 19-20a). Mais surpreendente é o fato de que o contrário também é verdadeiro: a inibição da síntese de ATP bloqueia a transferência de elétrons em mitocôndrias intactas. Esse acoplamento obrigatório pode ser demonstrado em mitocôndrias isoladas, fornecendo-se $O_2$ e substratos oxidáveis, mas não ADP (Figura 19-20b). Nessas condições, nenhuma síntese de ATP pode ocorrer, e a transferência de elétrons para o $O_2$ não prossegue. Henry Lardy, pioneiro no uso de antibióticos para explorar a função mitocondrial, demonstrou o acoplamento entre a oxidação e a fosforilação usando oligomicina e venturicidina, antibióticos tóxicos que se ligam à ATP-sintase nas mitocôndrias. Esses compostos são inibidores potentes da síntese de ATP *e* da transferência de elétrons pela cadeia de transportadores até o $O_2$ (Figura 19-20b). Como se sabe que a oligomicina não interage diretamente com os carregadores de elétrons, mas com a ATP-sintase, a transferência de elétrons e a síntese de ATP são obrigatoriamente acopladas: nenhuma reação ocorre sem a outra.

Henry Lardy, 1917–2010

A teoria quimiosmótica explica prontamente a dependência da transferência de elétrons em relação à síntese de ATP nas mitocôndrias. Quando o fluxo de prótons para dentro da matriz através do canal proteico da ATP-sintase é bloqueado (p. ex., com oligomicina), não existe nenhum caminho para o retorno dos prótons para a matriz, e a extrusão continuada de prótons da matriz governada pela atividade da cadeia respiratória gera um grande gradiente de prótons. A força próton-motriz se acumula até que o custo (energia livre) de bombear prótons para fora da matriz contra esse gradiente se iguale ou exceda a energia liberada

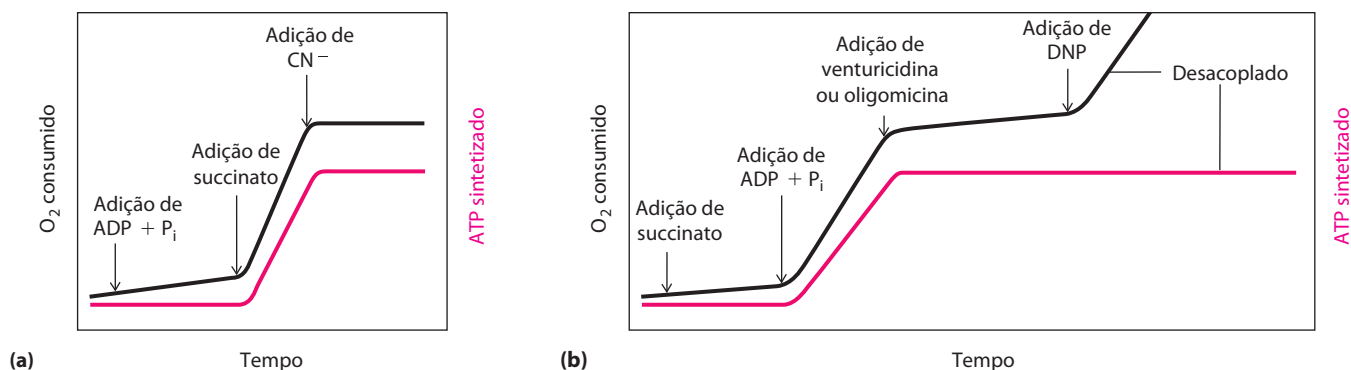



**FIGURA 19-20 Acoplamento da transferência de elétrons e da síntese de ATP em mitocôndrias.** Em experimentos para a demonstração do acoplamento, as mitocôndrias são suspensas em um meio tamponado, e um eletrodo de $O_2$ monitora o consumo de $O_2$. Em intervalos, amostras são removidas e analisadas para a presença de ATP. **(a)** A adição isolada de ADP e $P_i$ resulta em pequeno ou nenhum aumento da respiração (consumo de $O_2$; em preto) ou da síntese de ATP (em cor-de-rosa). Quando succinato é adicionado, a respiração inicia imediatamente e ATP é sintetizado. A adição de cianeto ($CN^-$), que bloqueia a transferência de elétrons entre a citocromo-oxidase (complexo IV) e o $O_2$, inibe tanto a respiração quanto a síntese de ATP. **(b)** Mitocôndrias providas de succinato respiram e sintetizam ATP somente quando ADP e $P_i$ são adicionados. A adição posterior de venturicidina ou oligomicina, inibidores da ATP-sintase, bloqueia a síntese de ATP e a respiração. Dinitrofenol (DNP) é um desacoplador, permitindo que a respiração continue sem a síntese de ATP.

pela transferência de elétrons do NADH ao $O_2$. Nesse ponto, o fluxo de elétrons deve parar; a energia livre para o processo global de fluxo de elétrons acoplado ao bombeamento de prótons torna-se zero, e o sistema está em equilíbrio.

Certas condições e reagentes podem, no entanto, desacoplar a oxidação da fosforilação. Quando mitocôndrias intactas são rompidas por tratamento com detergentes ou por ação física, os fragmentos de membrana resultantes ainda podem catalisar a transferência de elétrons do succinato ou do NADH para o $O_2$, mas nenhuma síntese de ATP está acoplada a essa respiração. Alguns compostos químicos causam o desacoplamento sem romper a estrutura mitocondrial. Desacopladores químicos incluem 2,4-dinitrofenol (DNP) e carbonilcianeto-*p*-trifluormetoxifenilidrazona (FCCP) (Tabela 19-4; **Figura 19-21**), ácidos fracos com propriedades hidrofóbicas que lhes permitem difundir prontamente através das membranas mitocondriais. Depois de entrarem na matriz na forma protonada, eles podem liberar um próton, assim dissipando o gradiente de prótons. Estabilização por ressonância desloca a carga nas formas aniônicas, tornando-as suficientemente permeantes para se difundirem de volta através da membrana, onde elas podem captar um próton e repetir o processo. Ionóforos como a valinomicina (ver Figura 11-44) permitem que íons inorgânicos passem facilmente através das membranas. Ionóforos desacoplam a transferência de elétrons da fosforilação oxidativa, dissipando a contribuição elétrica ao gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial.

Uma previsão da teoria quimiosmótica é que, devido ao papel da transferência de elétrons na síntese de ATP mitocondrial ser simplesmente bombear prótons para criar o gradiente eletroquímico da força próton-motriz, um gradiente de prótons artificialmente criado deveria ser capaz de substituir a transferência de elétrons no desencadeamento da síntese de ATP. Isso foi confirmado experimentalmente (**Figura 19-22**). Mitocôndrias manipuladas de forma a se impor uma diferença de concentração de prótons e uma separação de cargas através da membrana interna sintetizam ATP *na ausência de um substrato oxidável*; a força próton-motriz sozinha é suficiente para gerar a síntese de ATP.

OH, $NO_2$, $NO_2$ ⇌ $O^-$, $NO_2$, $NO_2$ + $H^+$

2,4-Dinitrofenol
(DNP)

N≡C, C≡N, C, N, NH, O, F—C—F, F ⇌ N≡C, C≡N, C, N, $N^-$, O, F—C—F, F + $H^+$

Carbonilcianeto-*p*-
-trifluormetoxifenilidrazona
(FCCP)

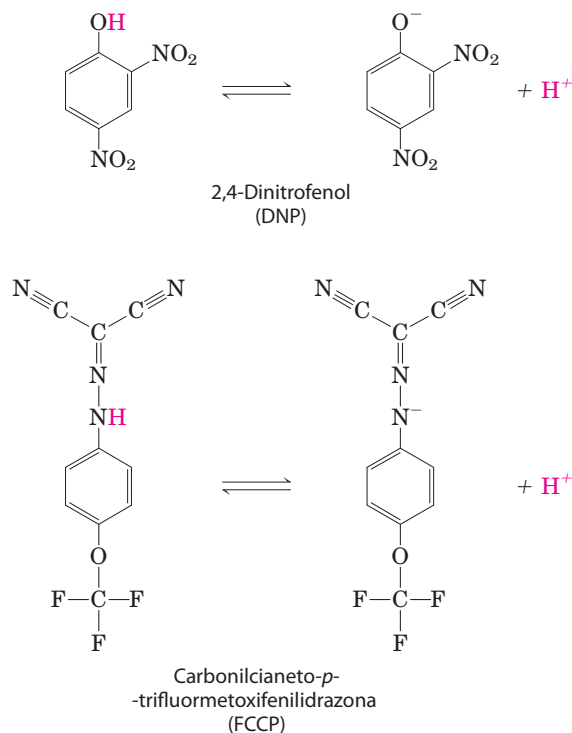



**FIGURA 19-21 Dois desacopladores químicos da fosforilação oxidativa.** Tanto DNP quanto FCCP têm um próton dissociável e são muito hidrofóbicos. Eles carregam prótons através da membrana mitocondrial interna, dissipando o gradiente de prótons. Os dois também desacoplam a fotofosforilação (ver Figura 19-65).

**FIGURA 19-22 Evidência para o papel de um gradiente de prótons na síntese de ATP.** Um gradiente eletroquímico imposto artificialmente pode gerar a síntese de ATP na ausência de um substrato oxidável como doador de elétrons. Neste experimento de duas etapas, **(a)** mitocôndrias isoladas são primeiramente incubadas em um tampão de pH 9 contendo KCl 0,1 M. Um lento vazamento de tampão e KCl para dentro das mitocôndrias após um certo tempo deixa a matriz em equilíbrio com o meio circundante. Nenhum substrato oxidável está presente. **(b)** As mitocôndrias são agora retiradas do tampão de pH 9 e ressuspensas em tampão de pH 7 contendo valinomicina, na ausência de KCl. A mudança de tampão cria uma diferença de duas unidades de pH através da membrana mitocondrial interna. O efluxo de $K^+$, carregado (por valinomicina) a favor de seu gradiente de concentração sem um contra-íon, cria um equilíbrio de carga através da membrana (matriz negativa). A soma do potencial químico proporcionado pela diferença de pH e do potencial elétrico proporcionado pela separação de cargas é uma força próton-motriz grande o suficiente para sustentar a síntese de ATP na ausência de um substrato oxidável.

## A ATP-sintase tem dois domínios funcionais, $F_o$ e $F_1$

A ATP-sintase mitocondrial é uma ATPase do tipo F (ver Figura 11-39), similar em estrutura e mecanismo às ATP-sintases de cloroplastos e bactérias. Esse grande complexo enzimático da membrana mitocondrial interna catalisa a formação de ATP a partir de ADP e $P_i$, impulsionada pelo fluxo de prótons do lado P para o lado N da membrana (Equação 19-10). A ATP-sintase, também chamada de complexo V, tem dois componentes distintos: $F_1$, proteína periférica de membrana, e $F_o$ (*o* indicando sensível à oligomicina), integral à membrana. $F_1$, o primeiro fator reconhecido como essencial para a fosforilação oxidativa, foi identificado e purificado por Efraim Racker e colaboradores no começo da década de 1960.

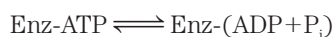
Efraim Racker, 1913–1991

No laboratório, pequenas vesículas de membrana formadas a partir das membranas mitocondriais internas realizam a síntese de ATP acoplada à transferência de elétrons. Quando $F_1$ é gentilmente extraído, as vesículas "desnudas" ainda contêm cadeias respiratórias intactas e a porção $F_o$ da ATP-sintase. As vesículas podem catalisar a transferência de elétrons do NADH ao $O_2$, mas não podem produzir um gradiente de prótons: $F_o$ tem um poro para prótons por meio do qual os prótons vazam tão rapidamente quanto são bombeados pela transferência de elétrons, e sem um gradiente de prótons as vesículas desprovidas de $F_1$ não podem produzir ATP. O $F_1$ isolado catalisa a hidrólise de ATP (o reverso da síntese), sendo, portanto, originalmente chamado de **$F_1$-ATPase**. Quando F1 purificado é adicionado de volta às vesículas, ele se associa novamente com $F_o$, fechando seu poro de prótons e restaurando a capacidade da membrana de acoplar a transferência de elétrons à síntese de ATP.

## O ATP é estabilizado em relação ao ADP na superfície de $F_1$

Experimentos de troca de isótopos com $F_1$ purificado revelam um fato notável sobre o mecanismo catalítico da enzima: na superfície da enzima, a reação ADP + $P_i \rightleftharpoons$ ATP + $H_2O$ é prontamente reversível – a variação de energia livre para a síntese de ATP é próxima de zero! Quando o ATP é hidrolisado por $F_1$ na presença de água marcada com $^{18}O$, o $P_i$ liberado contém um átomo de $^{18}O$. Uma medida cuidadosa do conteúdo de $^{18}O$ do $P_i$ formado *in vitro* pela hidrólise de ATP catalisada por $F_1$ revela que o $P_i$ tem não um, mas três ou quatro átomos de $^{18}O$ (**Figura 19-23**). Isso indica que a ligação pirofosfato na extremidade do ATP é quebrada e refeita repetidamente antes que o $P_i$ deixe a superfície da enzima. Com o $P_i$ livre para se deparar com seu sítio de ligação, cada hidrólise insere $^{18}O$ aleatoriamente em uma de quatro posições na molécula. Essa reação de troca ocorre em complexos $F_oF_1$ não energizados (sem gradiente de prótons) e com $F_1$ isolado – a troca não requer acréscimo de energia.

Estudos cinéticos das taxas iniciais de síntese e hidrólise de ATP confirmam a conclusão de que $\Delta G'°$ para a síntese de ATP na enzima é próximo de zero. A partir das taxas medidas de hidrólise ($k_1 = 10\ s^{-1}$) e síntese ($k_{-1} = 24\ s^{-1}$), a constante de equilíbrio calculada para a reação

$$\text{Enz-ATP} \rightleftharpoons \text{Enz-(ADP+P}_i)$$

é

$$K'_{eq} = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{24\ s^{-1}}{10\ s^{-1}} = 2{,}4$$

A partir deste $K'_{eq}$, o $\Delta G'°$ aparente calculado é próximo de zero. Isto é muito diferente do $K'_{eq}$ de cerca de $10^5$ ($\Delta G'° = -30{,}5$ kJ/mol) para a hidrólise de ATP livre em solução (não na superfície da enzima).

O que explica essa enorme diferença? A ATP-sintase estabiliza o ATP em relação a ADP + $P_i$ ligando o ATP mais

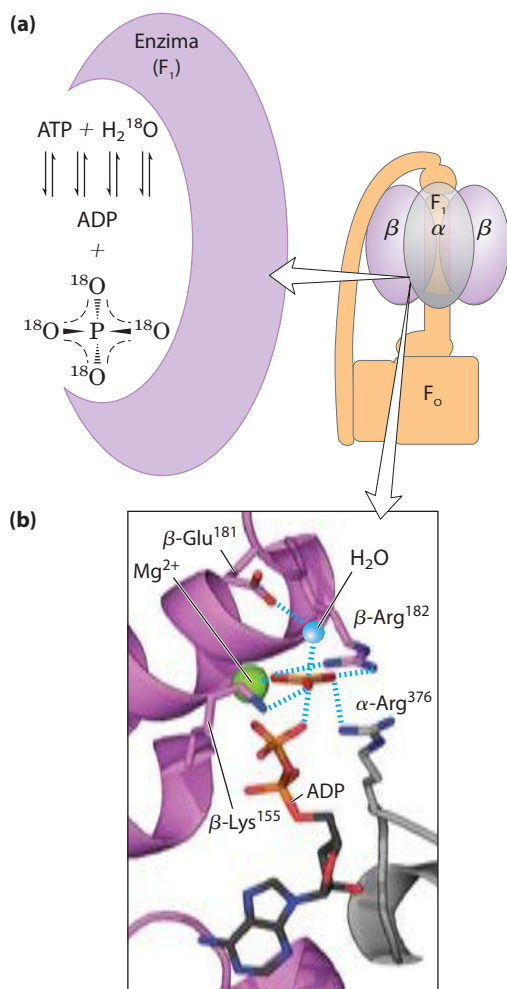



**FIGURA 19-23 Mecanismo catalítico de $F_1$. (a)** Experimento de troca de $^{18}O$. $F_1$ solubilizado de membranas mitocondriais é incubado com ATP na presença de água marcada com $^{18}O$. Em intervalos, uma amostra da solução é retirada e analisada para detectar a incorporação de $^{18}O$ no $P_i$ produzido a partir da hidrólise de ATP. Em minutos, o $P_i$ contém três ou quatro átomos de $^{18}O$, indicando que tanto a hidrólise de ATP quanto a síntese de ATP ocorreram diversas vezes durante a incubação. **(b)** Provável complexo do estado de transição para a hidrólise e a síntese de ATP pela ATP-sintase (derivada de PDB ID 1BMF). A subunidade $\alpha$ é mostrada em cinza, a $\beta$ em roxo. Os resíduos positivamente carregados $\beta$-Arg$^{182}$ e $\alpha$-Arg$^{376}$ coordenam-se com dois oxigênios do intermediário fosfato pentavalente; $\beta$-Lys$^{155}$ interage com um terceiro oxigênio, e o íon $Mg^{2+}$ estabiliza ainda mais o intermediário. A esfera azul representa o grupo que sai ($H_2O$). Estas interações resultam no pronto equilíbrio de ATP e ADP + $P_i$ no sítio ativo.

fortemente, liberando energia suficiente para contrabalançar o custo da produção de ATP. Medidas cuidadosas das constantes de ligação mostram que $F_oF_1$ liga ATP com afinidade muito alta ($K_d \leq 10^{-12}$ M) e ADP com afinidade muito mais baixa ($K_d \approx 10^{-5}$ M). A diferença em $K_d$ corresponde a uma diferença de cerca de 40 kJ/mol em energia de ligação, e essa energia de ligação direciona o equilíbrio em direção à formação do produto ATP.

## O gradiente de prótons impulsiona a liberação de ATP a partir da superfície da enzima

Embora a ATP-sintase equilibre o ATP com ADP + $P_i$ na ausência de um gradiente de prótons, o ATP recém-sintetizado não sai da superfície da enzima. É o gradiente de prótons que faz a enzima liberar o ATP formado em sua superfície. O diagrama de coordenadas de reação do processo (**Figura 19-24**) ilustra a diferença entre o mecanismo da ATP-sintase e aquele de muitas outras enzimas que catalisam reações endergônicas.

Para a síntese continuada de ATP, a enzima precisa oscilar entre uma forma que liga ATP muito fortemente e uma forma que libera ATP. Estudos químicos e cristalográficos

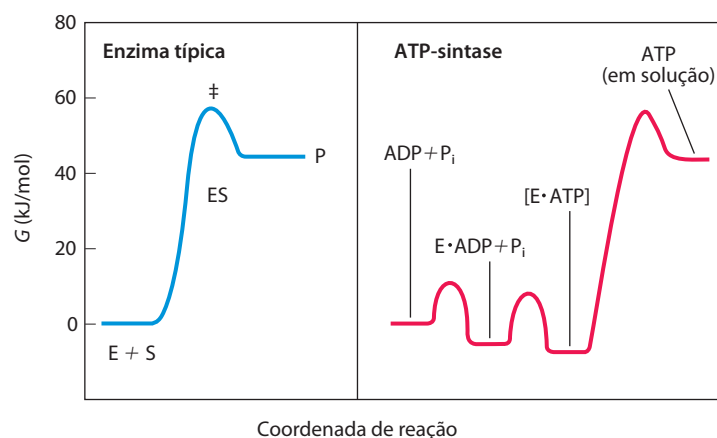



**FIGURA 19-24 Diagramas de coordenadas de reação para a ATP-sintase e para uma enzima mais típica.** Em uma reação típica catalisada por enzima (à esquerda), alcançar o estado de transição (‡) entre substrato e produtos é a principal barreira energética a ser superada. Na reação catalisada pela ATP-sintase (à direita), a liberação de ATP a partir da enzima, e não a formação de ATP, é a principal barreira energética. A variação de energia livre para a formação de ATP a partir de ADP e $P_i$ em solução aquosa é grande e positiva, mas na superfície da enzima a ligação muito firme do ATP proporciona energia de ligação suficiente para trazer a energia livre do ATP ligado à enzima para perto daquela de ADP + $P_i$, de forma que a reação é prontamente reversível. A constante de equilíbrio é próxima de 1. A energia livre necessária para a liberação do ATP é fornecida pela força próton-motriz.

da ATP-sintase revelaram a base estrutural para essa alternância de função.

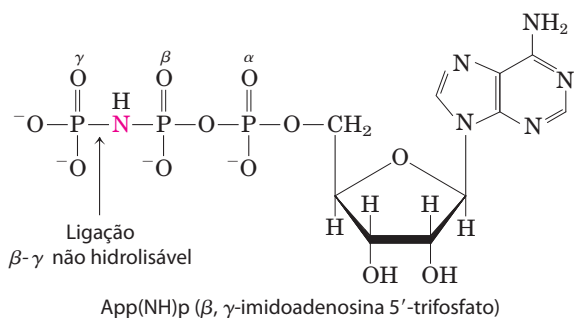
## Cada subunidade $\beta$ da ATP-sintase pode assumir três diferentes conformações

O $F_1$ mitocondrial tem nove subunidades de cinco diferentes tipos, com a composição $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$. Cada uma das três subunidades $\beta$ tem um sítio catalítico para a síntese de ATP. A determinação cristalográfica da estrutura de $F_1$ por John E. Walker e colaboradores revelou detalhes estruturais muito úteis em explicar o mecanismo catalítico da enzima. A porção de $F_1$ em forma de maçaneta é uma esfera achatada, com 8 nm de altura e 10 nm de largura, consistindo em subunidades $\alpha$ e $\beta$ alternadas, arranjadas como os gomos de uma laranja (**Figura 19-25a, b, c**). Os polipeptídeos que formam a haste na estrutura cristalina de $F_1$ estão assimetricamente arranjados, com um domínio da única subunidade $\gamma$ constituindo o eixo central que passa através de $F_1$ e um outro domínio de $\gamma$ associado principalmente com uma das três subunidades $\beta$, denominado $\beta$-vazio (Figura 19-25b). Embora as sequências de aminoácidos das três subunidades $\beta$ sejam idênticas, *suas conformações diferem*, em parte devido à associação da subunidade $\gamma$ com apenas uma das três. As estruturas das subunidades $\delta$ e $\varepsilon$ não foram reveladas nestes estudos cristalográficos.

John E. Walker

As diferenças conformacionais entre as subunidades $\beta$ se estendem a diferenças em seus sítios de ligação de ATP/ADP. Quando os pesquisadores cristalizaram a proteína na presença de ADP e App(NH)p, um análogo estrutural bastante semelhante ao ATP que não pode ser hidrolisado pela atividade ATPásica de $F_1$, o sítio de ligação de uma das três subunidades $\beta$ foi preenchido com App(NH)p, o segundo foi preenchido com ADP e o terceiro estava vazio. As conformações das subunidades $\beta$ correspondentes são designadas $\beta$-ATP, $\beta$-ADP e $\beta$-vazio (Figura 19-25b). Essa diferença na ligação de nucleotídeos entre as três subunidades é crítica para o mecanismo do complexo.

Ligação $\beta$-$\gamma$ não hidrolisável

App(NH)p ($\beta$, $\gamma$-imidoadenosina 5′-trifosfato)

O complexo $F_o$, com seu poro de prótons, é composto por três subunidades, a, b e c, na proporção $ab_2c_n$, onde $n$ varia de 8 a 15 em vários organismos; em leveduras, é 10. A subunidade c é um polipeptídeo pequeno ($M_r$ 8.000), muito hidrofóbico, consistindo quase que inteiramente em duas hélices transmembrana, com uma pequena alça se estendendo do lado da matriz da membrana. A estrutura cristalina de $F_oF_1$ de leveduras, elucidada em 1999, mostra 10 subunidades c, cada uma com duas hélices transmembrana grosseiramente perpendiculares ao plano da membrana e arranjadas em dois círculos concêntricos. O círculo mais interno é composto por hélices com os terminais amino de cada subunidade c; o círculo mais externo, com cerca de 55 Å de diâmetro, é composto pelas hélices com terminais carboxil. *As subunidades c neste anel c giram juntas como uma unidade ao redor de um eixo perpendicular à membrana.* As subunidades $\varepsilon$ e $\gamma$ de $F_1$ formam uma "perna com pé" que se projeta do lado de baixo (do lado da membrana) de $F_1$ e que se sustenta firmemente sobre o anel das subunidades c. A subunidade a consiste em várias hélices hidrofóbicas que atravessam a membrana em íntima associação com uma das subunidades c no anel c. O desenho esquemático na Figura 19-25a combina a informação estrutural dos estudos de $F_1$ bovino, de $F_oF_1$ de leveduras, e do anel c de *Ilyobacter tartaricus*.

## A catálise rotacional é a chave para o mecanismo de alteração na ligação durante a síntese de ATP

Com base na cinética detalhada e em estudos de ligação das reações catalisadas por $F_oF_1$, Paul Boyer propôs um mecanismo de **catálise rotacional** no qual os três sítios ativos de $F_1$ se revezam catalisando a síntese de ATP (**Figura 19-26**). Uma dada subunidade $\beta$ começa na conformação $\beta$--ADP, que liga ADP e $P_i$ do meio circundante. A subunidade agora muda de conformação, assumindo a forma $\beta$-ATP, que se liga firmemente e estabiliza o ATP, gerando o pronto equilíbrio de ADP + $P_i$ com ATP na superfície da enzima. Finalmente, a subunidade muda para a conformação $\beta$--vazio, que tem baixa afinidade por ATP, e o ATP recém--sintetizado deixa a superfície da enzima. Outra rodada de catálise começa quando essa subunidade novamente assume a forma $\beta$-ADP e liga ADP e $P_i$.

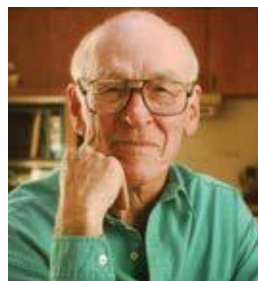
As mudanças conformacionais importantes nesse mecanismo são desencadeadas pela passagem de prótons pela porção $F_o$ da ATP-sintase. A corrente de prótons através do poro $F_o$ faz o cilindro de subunidades c e a subunidade $\gamma$ a ele encaixada rodar ao longo do eixo longo de $\gamma$, que é perpendicular ao plano da membrana. A subunidade $\gamma$ passa pelo centro do esferoide $\alpha_3\beta_3$, mantido estacionário em relação à superfície da membrana pelas subunidades $b_2$ e $\delta$ (Figura 19-

Paul Boyer

**FIGURA 19-25 Complexo de ATP-sintase mitocondrial.** **(a)** Uma visão em desenho do complexo $F_oF_1$. **(b)** (PDB ID 1BMF and PDB ID 1JNV) $F_1$ visto de cima (ou seja, do lado N da membrana), mostrando os três subunidades $\beta$ (tons de roxo) e $\alpha$ (tons de cinza) e o eixo central (subunidade $\gamma$, verde). Cada subunidade $\beta$, perto de sua interface com a subunidade $\alpha$ vizinha, tem um sítio de ligação de nucleotídeo crucial para a atividade catalítica. A subunidade $\gamma$ isolada associa-se primariamente com um dos três pares $\alpha\beta$, forçando cada uma das subunidades $\beta$ para conformações levemente diferentes, com diferentes sítios de ligação de nucleotídeos. Na enzima cristalina, uma subunidade ($\beta$ ADP) tem ADP (em amarelo) em seu sítio de ligação, a próxima ($\beta$-ATP) tem ATP (em vermelho) e a terceira ($\beta$-vazio) não tem qualquer nucleotídeo ligado.

**(c)** A enzima inteira vista de lado (no plano da membrana). A porção F1 (PDB IDs 1BMF, 1JNV, e 2A7U) tem três subunidades $\alpha$ e três subunidades $\beta$, arranjadas como os gomos de uma laranja ao redor de um eixo central, a subunidade $\gamma$ (verde). (Duas subunidades $\alpha$ e uma subunidade $\beta$ foram omitidas para expor a subunidade $\gamma$ e os sítios de ligação para ATP e ADP nas subunidades $\beta$). A subunidade $\delta$ confere sensibilidade à oligomicina na ATP-sintase, e a subunidade $\varepsilon$ pode servir para inibir sua atividade ATPase sob algumas circunstâncias. A subunidade $F_o$ consiste em uma subunidade a e duas subunidades b (PDB ID 2CLY e PDB ID 1B9U), que ancoram o complexo $F_oF_1$ na membrana e atuam como estator, segurando as subunidades $\alpha$ e $\beta$ no lugar. O $F_o$ também inclui o anel c, composto por um número (8 a 15, dependendo da espécie) de subunidades c idênticas, proteínas hidrofóbicas pequenas. O anel c e a subunidade a interagem para prover uma rota transmembrana para prótons. Cada subunidade c tem um resíduo de Asp perto do meio da membrana, o qual pode ligar ou liberar um próton. Nesta estrutura (PDB ID 1YCE), foi mostrado o anel homólogo $c_{11}$ da $Na^+$-ATPase de *Ilyobacter tartaricus*, para a qual a estrutura está bem estabelecida. Os seus sítios de ligação de $Na^+$, que correspondem aos sítios de ligação de prótons no complexo $F_oF_1$, são mostrados com seus íons $Na^+$ ligados (esferas vermelhas). **(d)** Uma vista de $F_o$ perpendicular à membrana. Cada uma das subumidades c em $F_o$ tem um resíduo de Asp crítico perto do meio da membrana, que sofre protonação/desprotonação durante o ciclo catalítico da ATP-sintase. Da mesma forma que em (c), as esferas vermelhas representam os sítios de ligação de $Na^+$ ou de prótons nos resíduos de Asp.

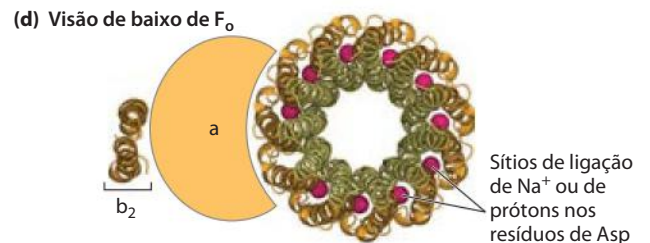
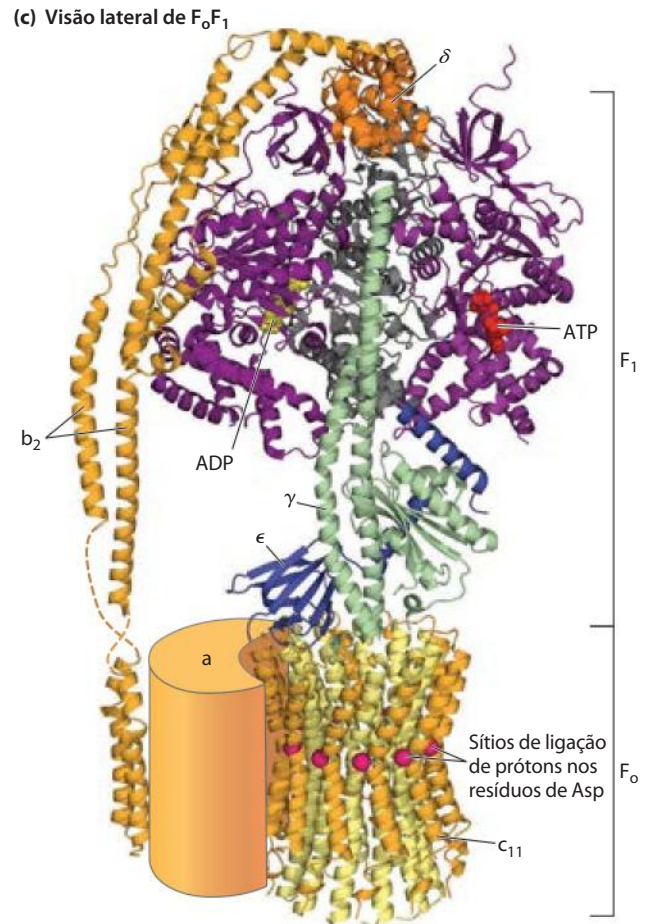
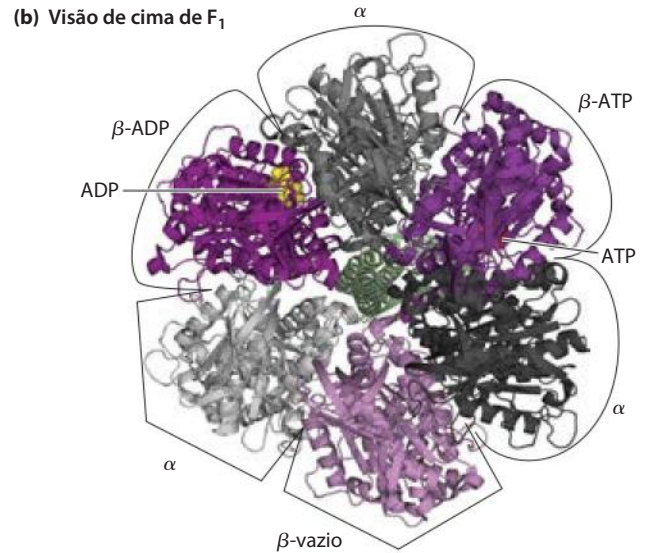
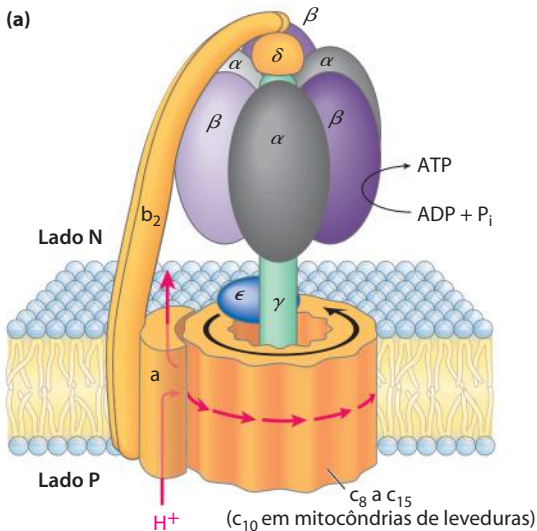
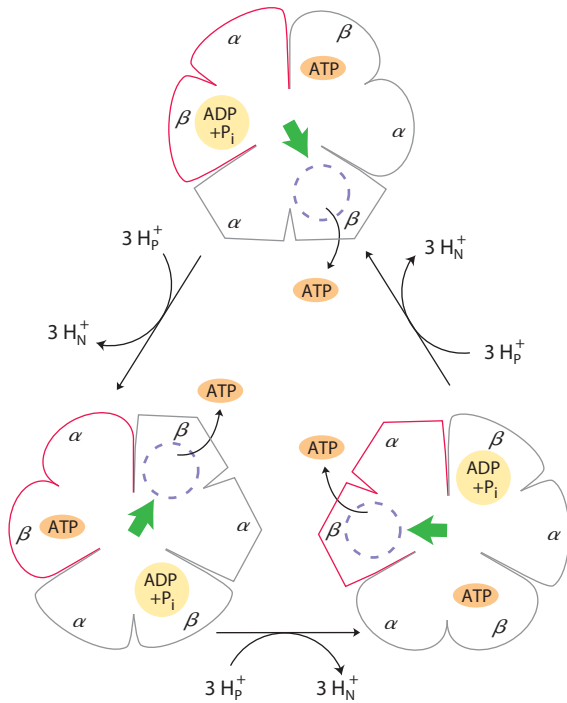



**FIGURA 19-26 Modelo de troca de ligação para a ATP-sintase.** O complexo $F_1$ tem três sítios não equivalentes para ligação de nucleotídeos de adenina, um para cada par de subunidades $\alpha$ e $\beta$. A cada momento, um destes sítios está na conformação $\beta$-ATP (que liga firmemente ATP), um segundo está na conformação $\beta$-ADP (ligação frouxa) e um terceiro está na conformação $\beta$-vazio (ligação muito frouxa). A força próton-motriz causa a rotação do eixo central – a subunidade $\gamma$, mostrada com seta verde – que entra em contato com cada par de subunidades $\alpha\beta$ em sucessão. Isto produz uma mudança conformacional cooperativa, na qual o sítio $\beta$-ATP é convertido para a conformação $\beta$-vazio e o ATP se dissocia; o sítio $\beta$-ADP é convertido para a conformação $\beta$-ATP, que promove a condensação de ADP + $P_i$ ligados, para formar ATP; e o sítio $\beta$-vazio se torna um sítio $\beta$-ADP, que liga frouxamente ADP + $P_i$ vindos do solvente. Este modelo, com base em achados experimentais, requer que pelo menos dois destes três sítios catalíticos alternem em atividade; o ATP não pode ser liberado de um sítio a não ser que (e até que) ADP e $P_i$ se liguem ao outro sítio.

25a). A cada rotação de 120°, $\gamma$ entra em contato com uma diferente subunidade $\beta$, e o contato força a subunidade $\beta$ a tomar a conformação $\beta$-vazio.

As três subunidades $\beta$ interagem de modo que, quando uma assume a conformação $\beta$-vazio, sua vizinha em um dos lados *precisa* assumir a forma $\beta$-ADP e a outra vizinha a forma $\beta$-ATP. Assim, uma rotação completa da subunidade $\gamma$ faz cada subunidade $\beta$ passar por suas três conformações possíveis e, para cada rotação, três ATP são sintetizados e liberados da superfície da enzima.

Uma forte previsão desse **modelo de troca de ligação** é que a subunidade $\gamma$ deveria rotar em uma direção quando $F_oF_1$ está sintetizando ATP e na direção oposta quando a enzima está hidrolisando ATP. Essa previsão de rotação com hidrólise de ATP foi confirmada em experimentos elegantes nos laboratórios de Masasuke Yoshida e Kazuhiko Kinosita, Jr. A rotação de $\gamma$ em uma única molécula de $F_1$ foi observada microscopicamente, prendendo-se um polímero de actina fluorescente longo e fino a uma subunidade $\gamma$ e observando seu movimento em relação a $\alpha_3\beta_3$ imobilizado em uma lâmina de microscópio, à medida que o ATP era hidrolisado. (A reversão esperada da rotação quando ATP está sendo sintetizado não pôde ser testada neste experimento; não há gradiente de prótons para impulsionar a síntese de ATP). Quando todo o complexo $F_oF_1$ (não apenas $F_1$) era utilizado em experimento similar, todo o anel de subunidades c rotava com $\gamma$ (**Figura 19-27**). O "eixo" rotava na direção prevista ao longo de 360°. A rotação não era contínua, mas ocorria em três etapas distintas de 120°. Conforme calculado a partir da taxa conhecida de hidrólise de ATP por uma molécula de $F_1$ e do arraste por fricção sobre o longo polímero de

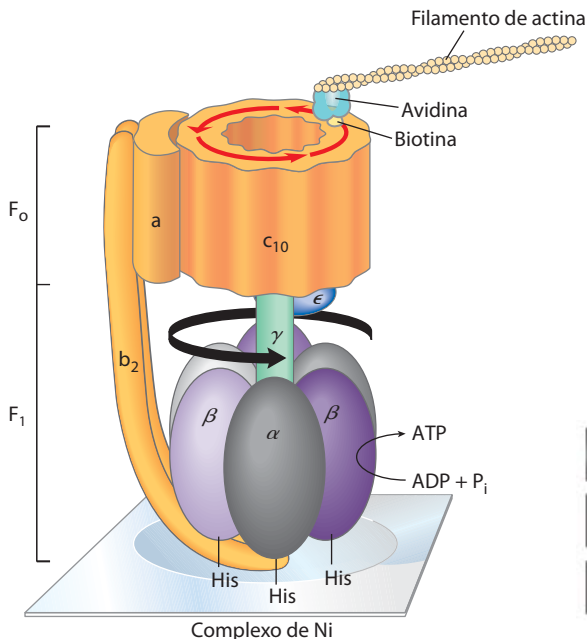
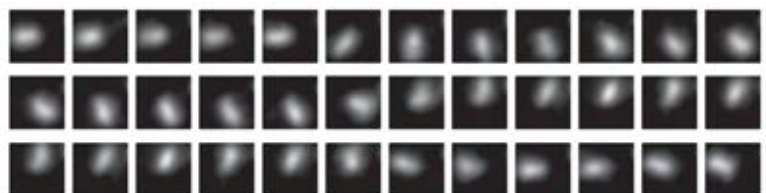



**FIGURA 19-27 Demonstração experimental da rotação de $F_o$ e $\gamma$.** $F_1$ geneticamente modificado para conter uma sequência de resíduos de His adere-se firmemente a uma lâmina de microscópio coberta com um complexo de Ni; a biotina é covalentemente ligada a uma subunidade c de $F_o$. A proteína avidina, que liga firmemente a biotina, está covalentemente ligada a longos filamentos de actina marcada com uma sonda fluorescente. A ligação biotina-avidina agora liga filamentos de actina à subunidade c. Quando o ATP é fornecido como substrato para a atividade ATPásica de $F_1$, observa-se o filamento marcado rodar continuamente em uma direção, provando que o cilindro $F_o$ de subunidades c gira. Em outro experimento, um filamento de actina fluorescente foi ligado diretamente à subunidade $\gamma$. A série de micrografias fluorescentes (ler da esquerda para a direita) mostra a posição do filamento de actina em intervalos de 133 ms. Observe que, à medida que o filamento gira, ele faz um salto discreto a cada cerca de 11 quadros de imagens. Presumivelmente, o cilindro e o eixo se movem como uma unidade.

actina, a eficiência desse mecanismo em converter energia química em movimento é próxima de 100%. Nas palavras de Boyer: "uma esplêndida máquina molecular".

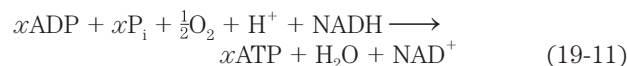
## De que forma o fluxo de prótons pelo complexo $F_o$ produz movimento rotacional?

Um modelo plausível para explicar como fluxo de prótons e o movimento rotacional estão acoplados no complexo $F_o$ é mostrado na **Figura 19–28**. As subunidades individuais em $F_o$ estão pré-arranjadas em um círculo ao redor de um miolo central, que está provavelmente preenchido com lipídeos de membrana. Em cada subunidade c, existe um importante resíduo de Asp (ou Glu) localizado perto do meio da membrana. Os prótons cruzam a membrana por uma rota feita de subunidades a e c. A subunidade a tem um meio canal de prótons conduzindo do citosol (lado P) para o meio da membrana, onde ele termina perto de um resíduo de Asp da subunidade c adjacente. Um próton difunde-se do lado citosólico (onde a concentração de prótons é relativamente alta) ao longo desse meio-canal e se liga ao resíduo de Asp, deslocando um resíduo de Arg positivamente carregado que tinha se associado com a Asp. Esse resíduo de Arg se desloca para o lado, formando uma interação com a Asp na subunidade c adjacente no anel e deslocando o próton daquela Asp; esse próton adjacente sai através do segundo meio-canal para o lado N, onde a concentração de prótons é relativamentre baixa, completando o movimento de um próton equivalente do lado de fora para o lado de dentro da matriz. Agora, um outro próton entrou no meio canal no lado citosólico, moveu-se até a Asp na próxima subunidade c, e a protonou, mais uma vez deslocando a Arg, que, por sua vez, desloca um próton da próxima subunidade c e assim por diante. O movimento rotacional do anel c é o resultado de movimento térmico (browniano), que se torna unidirecional pela grande diferença na concentração de prótons através da membrana. O número de prótons que precisa ser transferido para produzir uma rotação completa do anel c é igual ao número de subunidades c no anel. Estudos do anel c por microscopia de força atômica (Quadro 19-2) ou por raios X mostraram que o número de subunidades c é diferente em diferentes organismos (**Figura 19–29**). Em mitocôndrias animais, esse número é 8, em mitocôndrias de leveduras e em *E. coli* é 10, e o número de subunidades c pode atingir 15 na cianobactéria *Spirulina platensis*. A taxa de rotação em mitocôndrias intactas foi estimada em cerca de 6.000 rpm – 100 rotações por segundo!

**FIGURA 19-28 Um modelo para a rotação do anel c impulsionada por prótons.** A subunidade do complexo $F_o$ da ATP-sintase (ver Figura 19-25a) tem dois meio-canais hidrofílicos para prótons, um conduzindo do lado P para o meio da membrana e outro conduzindo do meio da membrana para o lado N (matriz). As subunidades c individuais em $F_0$ (10 na enzima de leveduras) estão arranjadas em um círculo ao redor de um miolo central. Cada subunidade c tem um importante resíduo de Asp aproximadamente no meio da membrana, que pode doar ou receber um próton ($H^+$ vermelho). A subunidade a tem uma cadeia lateral de Arg positivamente carregada, que forma uma interação eletrostática com o carboxilato de Asp negativamente carregado na subunidade c adjacente. Esta subunidade c é inicialmente posicionada de forma que um próton que entra no meio-canal no lado P (onde a concentração de prótons é relativamente alta) encontra e protona o resíduo de Asp, enfraquecendo sua interação com Arg. A cadeia lateral de Arg rota em direção ao resíduo protonado de Asp na próxima subunidade c e desloca seu próton carboxil, enquanto uma nova interação eletrostática Arg-Asp se forma. O próton deslocado move-se através do segundo meio-canal na subunidade a e é liberado no lado N. A subunidade c com seu resíduo de Asp desprotonado move-se de forma que seu par Arg-Asp fique de frente para o meio-canal no lado P, e um segundo ciclo começa: entrada de prótons, protonação de Asp, movimento de Arg e saída de prótons. A rotação do anel ocorre por movimento termal (browniano) e é reajustada de maneira eficiente; a orientação do gradiente de prótons dita a direção do fluxo de prótons e torna a rotação do anel c essencialmente unidirecional.

## O acoplamento quimiosmótico permite estequiometrias não integrais de consumo de $O_2$ e de síntese de ATP

Antes da aceitação geral do modelo quimiosmótico da fosforilação oxidativa, a pressuposição era de que a equação da reação global assumiria a seguinte forma:

$$x\text{ADP} + x\text{P}_i + \tfrac{1}{2}\text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{NADH} \longrightarrow x\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+ \qquad (19\text{-}11)$$

com o valor de $x$ – algumas vezes chamado de **razão P/O** ou **razão P/2$e^-$** – sendo sempre um número inteiro. Quando mitocôndrias intactas são suspensas em solução com um substrato oxidável como succinato ou NADH e são providas com $O_2$, a síntese de ATP é facilmente mensurável, assim como o decréscimo de $O_2$. A princípio, essas duas medidas deveriam produzir o número de ATP sintetizado por $O_2$ consumido, a razão P/O. A medida de P/O, no entanto, é complicada pelo fato de que mitocôndrias intactas *consomem* ATP em muitas reações não relacionadas que ocorrem na matriz, e consomem $O_2$ por propósitos outros que não o da fosforilação oxidativa. A contribuição dessas reações interferentes precisa ser cuidadosamente medida, e o cál-

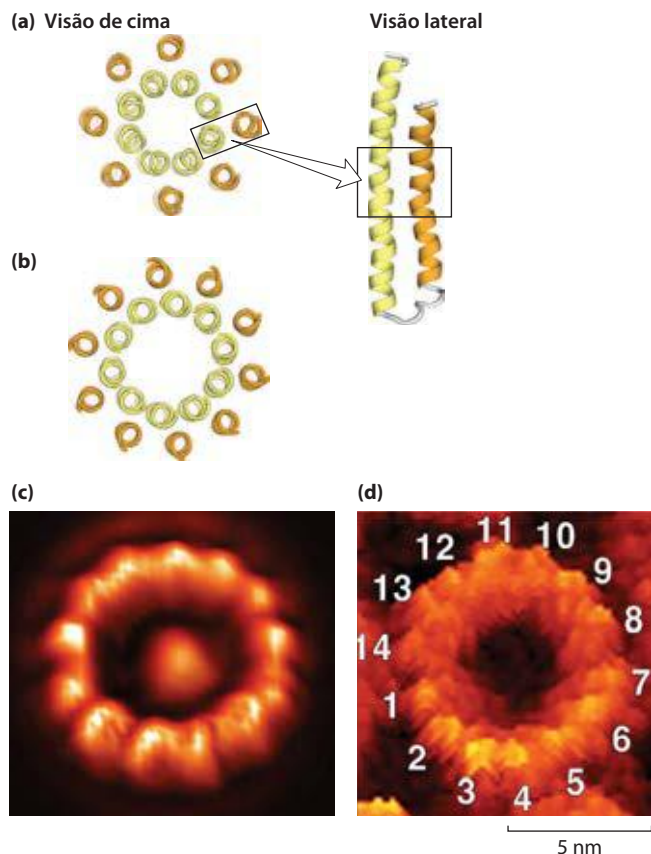



**FIGURA 19-29 Organismos diferentes têm números diferentes de subunidades c no anel c do complexo $F_o$.** A estrutura do anel c de várias espécies foi determinada por cristalografia por raios X. Cada hélice no anel central é a metade de uma subunidade c com formato de grampo de cabelo; o anel de hélices externo é a outra metade da estrutura de grampo. Visualizações do anel c perpendiculares à membrana mostram o número de subunidades c para **(a)** mitocôndrias bovinas (8) e **(b)** mitocôndrias de leveduras (10). Microscopia de força atômica foi utilizada para visualizar os anéis c **(c)** da bactéria termofílica *Bacillus* espécie TA2.A1 (13) e **(d)** de espinafre (14). De acordo com o modelo na Figura 19-28, diferentes números de subunidades c no anel c deveriam resultar em diferentes razões de ATP formado por par de elétrons que passam pela cadeia respiratória (diferentes razões P/O).

culo de P/O precisa ser corrigido para essas contribuições. A maioria dos experimentos gerou razões P/O (ATP para ½$O_2$) entre 2 e 3 quando NADH era o doador de elétrons e entre 1 e 2 quando succinato era o doador. Considerando a pressuposição de que P/O deveria ter um valor integral, a maioria dos pesquisadores concordou que as razões P/O devem ser de 3 para NADH e 2 para succinato e, durante anos, esses valores apareceram em artigos de pesquisa e em livros-texto.

Com a introdução do paradigma quimiosmótico para o acoplamento da síntese de ATP à transferência de elétrons, não havia qualquer requisito teórico para que P/O fosse um número inteiro. As questões relevantes sobre a estequiometria se tornaram: quantos prótons são bombeados para

## QUADRO 19-2 MÉTODOS Microscopia de força atômica para visualizar as proteínas de membrana

Na microscopia de força atômica (MFA), a ponta afiada de uma sonda presa a um suporte flexível é arrastada por uma superfície irregular como a de uma membrana (Figura Q-1). Interações eletrostáticas e de van der Waals entre a ponteira e a amostra produzem uma força que movimenta a sonda para cima e para baixo (na dimensão $z$), à medida que encontra montanhas e vales na amostra. Um feixe de *laser* refletido do suporte detecta movimentos tão pequenos quanto 1 Å. Em um tipo de microscópio de força atômica, a força na sonda é mantida constante (em relação a uma força padrão, na ordem de piconewtons) por um circuito de retroalimentação que faz a plataforma que sustenta a amostra subir ou descer para manter a força constante. Uma série de varreduras nas dimensões $x$ e $y$ (o plano da membrana) gera um mapa topográfico da superfície com uma resolução próxima à escala atômica —0,1 nm na dimensão vertical, 0,5 a 1,0 nm nas dimensões laterais.

Em casos favoráveis, a MFA pode ser usada para estudar moléculas individuais de proteínas de membrana, como as subunidades c do complexo $F_o$ (Figura 19–29c, d).

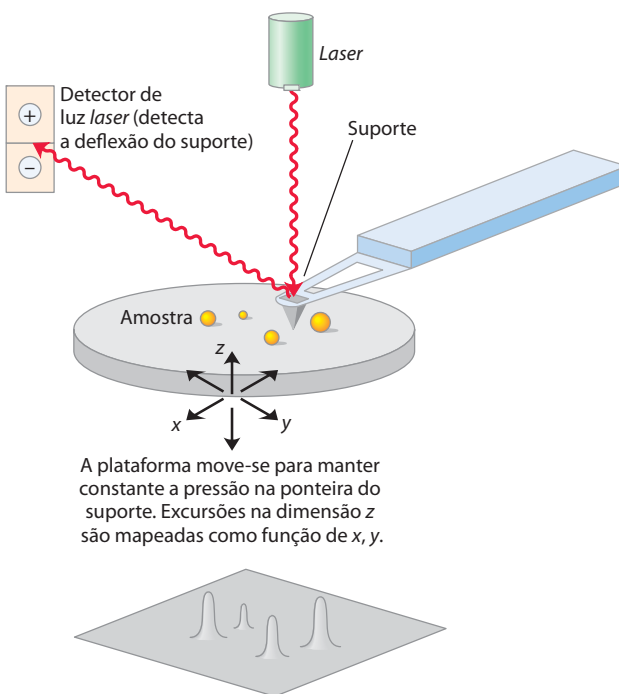



**FIGURA Q-1** O princípio da microscopia de força atômica.

fora pela transferência de elétrons de um NADH ao $O_2$ e quantos prótons precisam fluir para dentro por meio do complexo $F_oF_1$ para propiciar a síntese de ATP? A medida de fluxos de prótons é tecnicamente complicada; o pesquisador precisa considerar a capacidade de tamponamento das mitocôndrias, o vazamento não produtivo de prótons através da membrana interna e o uso do gradiente de prótons para outras funções que não a síntese de ATP, como propiciar o transporte de substratos através da membrana mitocondrial interna (descrito a seguir). Os valores experimentais consensuais para o número de prótons bombeados para fora por par de elétrons são de 10 para NADH e 6 para succinato (que envia elétrons para a cadeia respiratória no nível da ubiquinona). O valor experimental mais amplamente aceito para o número de prótons requeridos para possibilitar a síntese de uma molécula de ATP é 4, sendo que 1 é usado no transporte de $P_i$, ATP e ADP através da membrana mitocondrial (ver a seguir). Se 10 prótons são bombeados para fora por NADH e 4 precisam fluir para dentro para produzir 1 ATP, a razão P/O com base em prótons é 2,5 para NADH como doador de elétrons e 1,5 (6/4) para succinato.

## A força próton-motriz energiza o transporte ativo

Embora o papel primário do gradiente de prótons nas mitocôndrias seja fornecer energia para a síntese de ATP, a força próton-motriz também governa vários processos de transporte essenciais à fosforilação oxidativa. A membrana mitocondrial interna geralmente é impermeável a espécies carregadas, mas dois sistemas específicos transportam ADP e $P_i$ para dentro da matriz e ATP para o citosol (**Figura 19-30**).

A **adenina-nucleotídeo-translocase**, integral à membrana interna, liga $ADP^{3-}$ no espaço intermembrana e o transporta para a matriz, em troca de uma molécula de $ATP^{4-}$, simultaneamente transportada para fora (ver Figura 13-11 para as formas iônicas de ADP e ATP). Como esse antiportador move quatro cargas negativas para fora para cada três que são movidas para dentro, sua atividade é favorecida pelo gradiente eletroquímico transmembrana, que confere à matriz uma carga líquida negativa; a força próton-motriz propicia a troca ATP-ADP. A adenina-nucleotídeo-translocase é especificamente inibida por atractilosídeo, glicosídeo tóxico produzido por uma espécie de cardo. Se o transporte de ADP para dentro e o de ATP para fora das mitocôndrias são inibidos, o ATP citosólico não pode ser regenerado a partir do ADP, explicando a toxicidade do atractilosídeo.

Um segundo sistema de transporte de membrana essencial à fosforilação oxidativa é a **fosfato-translocase**, que promove o simporte de um $H_2PO_4^-$ e um $H^+$ para a matriz. Esse processo de transporte também é favorecido pelo gradiente de prótons transmembrana (Figura 19-30). Observe que o processo requer o movimento de um próton do lado P para o lado N da membrana interna, consumindo alguma energia da transferência de elétrons. Um complexo da ATP-sintase e ambas as translocases, o **ATP-sintassomo**, podem ser isolados das mitocôndrias por dissecação suave com detergentes, sugerindo que as funções dessas três proteínas são muito fortemente integradas.

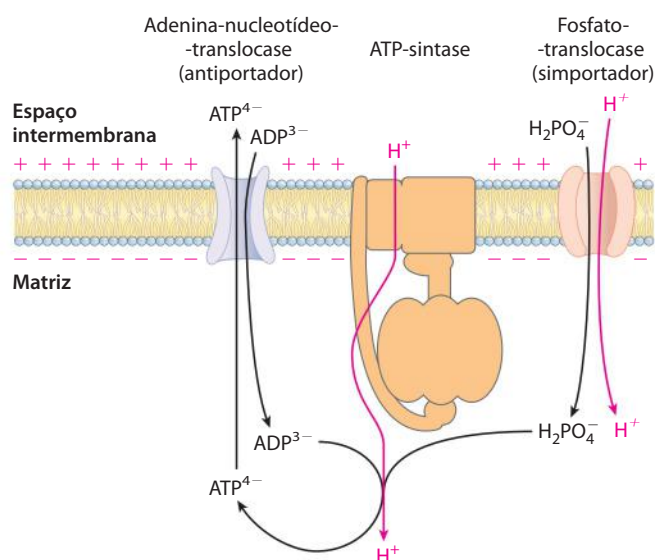



**FIGURA 19-30 Adenina-nucleotídeo e fosfato-translocases.** Sistemas de transporte da membrana mitocondrial interna carregam ADP e $P_i$ para a matriz e ATP recentemente sintetizado para o citosol. A adenina-nucleotídeo-translocase é um antiportador; a mesma proteína move ADP para a matriz e ATP para fora. O efeito de substituir $ATP^{4-}$ por $ADP^{3-}$ na matriz é o efluxo líquido de uma carga negativa, favorecido pela diferença de cargas através da membrana interna (positiva fora). Em pH 7, o $P_i$ está presente tanto como $HPO_4^{2-}$ quanto como $H_2PO_4^-$. A fosfato-translocase é específica para $H_2PO_4^-$. Não existe nenhum fluxo líquido de carga durante o simporte de $H_2PO_4^-$ e $H^+$, mas a concentração relativamente baixa de prótons na matriz favorece o movimento de $H^+$ para dentro. Assim, a força próton-motriz é responsável por proporcionar energia para a síntese de ATP e por transportar substratos (ADP e $P_i$) para dentro e produto (ATP) para fora da matriz mitocondrial. Todos esses três sistemas de transporte podem ser isolados como um único complexo ligado à membrana (ATP sintassomo).

**PROBLEMA RESOLVIDO 19-2** **Estequiometria da produção de ATP: efeito do tamanho do anel c**

(a) Se as mitocôndrias *bovinas* têm 8 subunidades c por anel c, qual a razão predita de ATP formado por NADH oxidado? (b) Qual o valor predito para as mitocôndrias de *leveduras*, com 10 subunidades c? (c) Quais os valores comparáveis de elétrons que entram na cadeia respiratória a partir do $FADH_2$?

**Solução:** (a) A questão solicita a determinação de quantos ATP são produzidos por NADH. Essa é outra forma de pedir para calcularmos a razão P/O, ou $x$ na Equação 19–11. Se o anel c tem 8 subunidades c, então um rotação completa transferirá 8 prótons para a matriz e produzirá 3 moléculas de ATP. Porém, esta síntese também requer o transporte de 3 $P_i$ para dentro da matriz, ao custo de 1 próton cada, acrescentando mais 3 prótons ao número requerido. Isso leva o custo total para (11 prótons) / (3 ATP) = 3,7 prótons/ATP. O valor consensual para o número de prótons bombeados para fora por par de elétrons transferidos do NADH é 10 (ver Figura 19–19). Assim, oxidar 1 NADH produz (10 prótons)/(3,7 prótons/ATP) = 2,7 ATP.

(b) Se o anel c tem 10 subunidades c, então uma rotação completa transferirá 10 prótons para a matriz e produzirá 3 moléculas de ATP. Acrescentando os 3 prótons para transportar os 3 $P_i$ para dentro da matriz traz o custo total para (13 prótons)/(3 ATP) = 4,3 prótons/ATP. A oxidação de 1 NADH produz (10 prótons)/(4,3 prótons/ATP) = 2,3 ATP.

(c) Quando os elétrons entram na cadeia respiratória a partir do $FADH_2$ (na ubiquinona), apenas 6 prótons estão disponíveis para impulsionar a síntese de ATP. Isso muda os cálculos para as mitocôndrias bovinas para (6 prótons)/(3,7 prótons/ATP) = 1,6 ATP por par de elétrons do $FADH_2$. Para as mitocôndrias de leveduras, o cálculo é (6 prótons)/(4,3 prótons/ATP) = 1,4 ATP por par de elétrons do $FADH_2$.

Esses valores calculados de $x$ ou da razão P/O definem uma faixa que inclui os valores experimentais de 2,5 ATP/NADH e 1,5 ATP/$FADH_2$, e, portanto, esses valores serão usados ao longo deste livro.

## Sistemas de lançadeiras conduzem indiretamente NADH citosólico para as mitocôndrias para oxidação

A NADH-desidrogenase da membrana mitocondrial interna de células animais pode aceitar elétrons somente do NADH na matriz. Considerando que a membrana interna não é permeável a NADH, como o NADH gerado pela glicólise no citosol pode ser reoxidado a $NAD^+$ pelo $O_2$ ao longo da cadeia respiratória? Sistemas especiais de lançadeiras carregam equivalentes redutores do NADH citosólico para as mitocôndrias por uma via indireta. A lançadeira de NADH mais conhecida, que funciona em mitocôndrias de fígado, rim e coração, é a **lançadeira do malato-aspartato** (**Figura 19-31**). Os equivalentes redutores do NADH citosólico são primeiro transferidos ao oxaloacetato citosólico para produzir malato, em uma reação catalisada pela malato-desidrogenase citosólica. O malato então formado passa através da membrana interna pelo transportador de malato-α-cetoglutarato. Dentro da matriz, os equivalentes redutores são passados ao $NAD^+$ pela ação da malato-de-

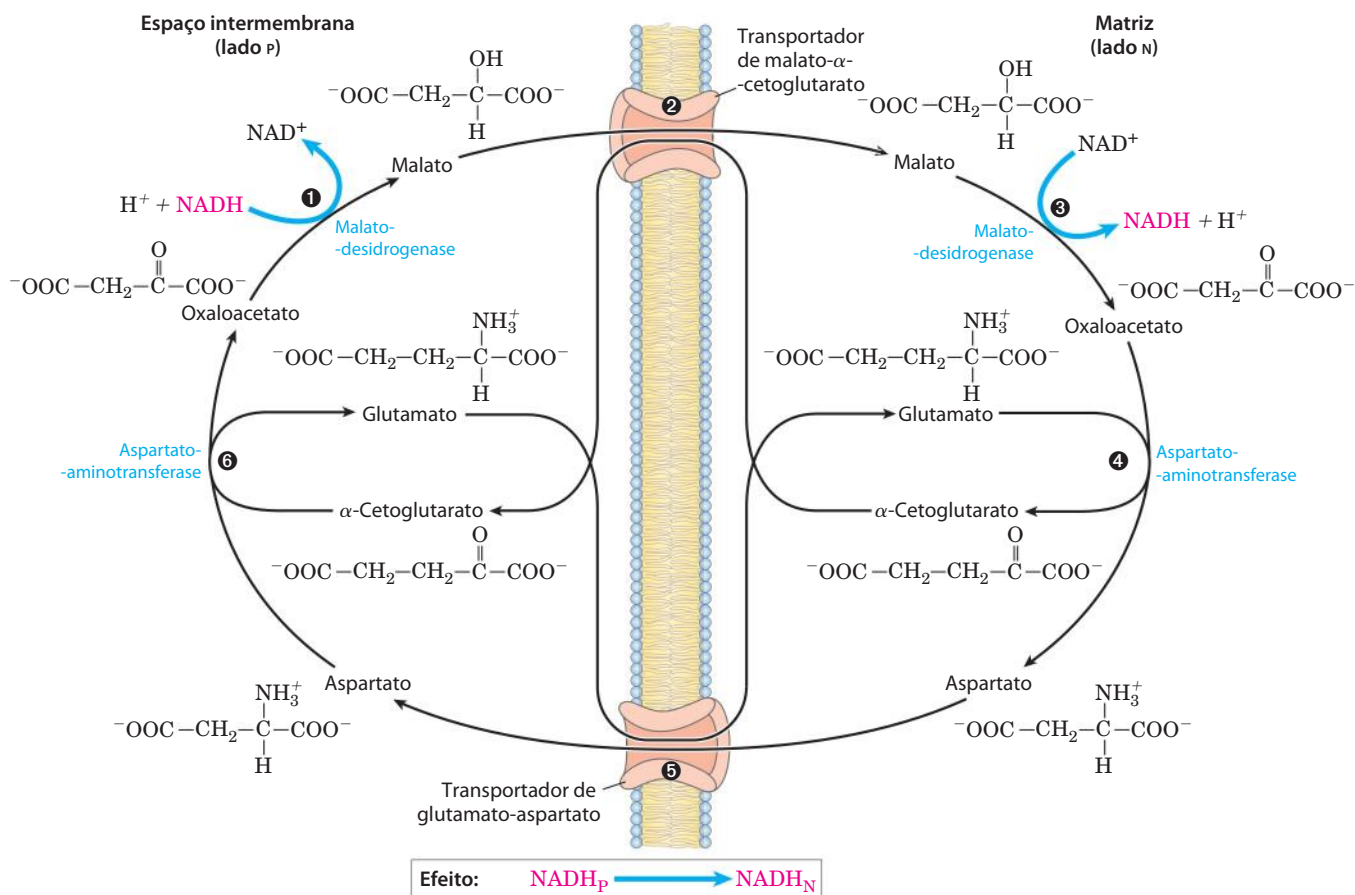



**FIGURA 19-31 Lançadeira do malato-aspartato.** Esta lançadeira para transporte de equivalentes redutores do NADH citosólico para dentro da matriz mitocondrial é usada em fígado, rim e coração. ❶ O NADH no citosol entra no espaço intermembrana por aberturas na membrana externa (porinas), então passa dois equivalentes redutores ao oxaloacetato, produzindo malato. ❷ O malato cruza a membrana interna via transportador de malato-α-cetoglutarato. ❸ Na matriz, o malato passa dois equivalentes redutores ao $NAD^+$, e o NADH resultante é oxidado pela cadeia respiratória; o oxaloacetato formado a partir do malato não pode passar diretamente para o citosol. ❹ O oxaloacetato é primeiro transaminado a aspartato e ❺ o aspartato pode sair via transportador de glutamato-aspartato. ❻ O oxaloacetato é regenerado no citosol, completando o ciclo.

sidrogenase da matriz, formando NADH; esse NADH pode passar elétrons diretamente à cadeia respiratória. Cerca de 2,5 moléculas de ATP são geradas à medida que esse par de elétrons passa para o $O_2$. O oxaloacetato citosólico precisa ser regenerado por reações de transaminação e atividade de transportadores de membrana para iniciar outro ciclo da lançadeira.

O músculo esquelético e o encéfalo usam uma lançadeira de NADH diferente, a **lançadeira do glicerol-3-fosfato** (**Figura 19-32**). Ela difere da lançadeira do malato-aspartato por entregar os equivalentes redutores do NADH para a ubiquinona e, então, para o complexo III, não o complexo I (Figura 19-8), proporcionando energia suficiente apenas para sintetizar 1,5 molécula de ATP por par de elétrons.

As mitocôndrias das plantas têm NADH-desidrogenase *externamente* orientada, que pode transferir elétrons diretamente do NADH citosólico para a cadeia respiratória no nível da ubiquinona. Como essa via desvia da NADH-desidrogenase do complexo I e do movimento associado de prótons, a produção de ATP a partir do NADH citosólico é menor do que aquela obtida a partir do NADH gerado na matriz (Quadro 19-1).

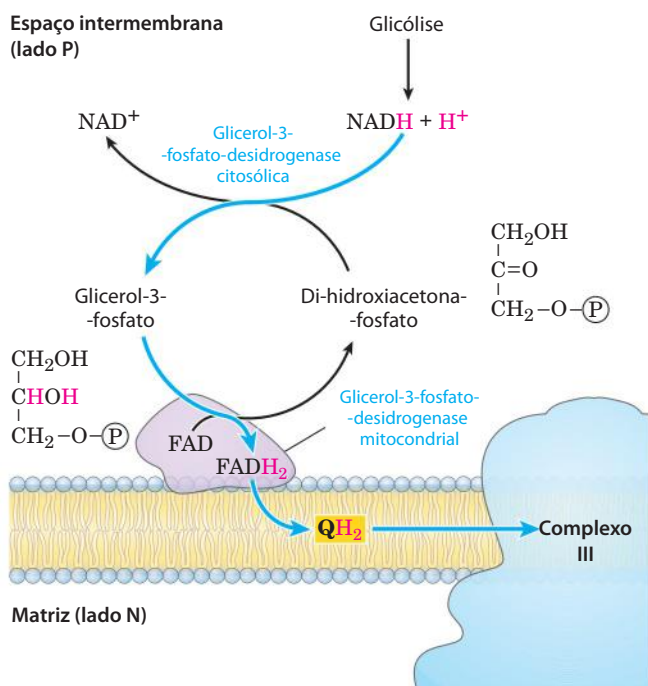



**FIGURA 19-32 Lançadeira do glicerol-3-fosfato.** Esta forma alternativa de mover equivalentes redutores do citosol para a matriz mitocondrial opera no músculo esquelético e no encéfalo. No citosol, di-hidroxiacetona-fosfato aceita dois equivalentes redutores do NADH em uma reação catalisada pela glicerol-3-fosfato-desidrogenase citosólica. Uma isoenzima da glicerol-3--fosfato-desidrogenase ligada à face externa da membrana interna transfere então dois equivalentes redutores do glicerol-3-fosfato no espaço intermembrana para a ubiquinona. Observe que esta transferência não envolve sistemas de transporte de membrana.

## RESUMO 19.2 Síntese de ATP

- O fluxo de elétrons pelos complexos I, III e IV resulta no bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna, tornando a matriz alcalina em relação ao espaço intermembrana. Esse gradiente de prótons fornece a energia (na forma de força próton-motriz) para a síntese de ATP a partir de ADP e $P_i$ pela ATP-sintase (complexo $F_oF_1$) na membrana interna.
- A ATP-sintase realiza a "catálise rotacional", onde o fluxo de prótons por $F_o$ faz cada um dos três sítios de ligação de nucleotídeos em $F_1$ variar entre as conformações (ADP+$P_i$)-ligado, ATP-ligado e vazia.
- A formação de ATP na enzima requer pouca energia; o papel da força próton-motriz é deslocar o ATP de seu sítio de ligação na sintase.
- A razão entre ATP sintetizado por ½$O_2$ reduzido e $H_2O$ (a razão P/O) é de cerca de 2,5 quando os elétrons entram na cadeia respiratória no complexo I, e 1,5 quando os elétrons entram na ubiquinona. Essa razão pode variar um pouco em diferentes organismos com base no número de subunidades c do complexo $F_o$.
- A energia conservada em um gradiente de prótons pode propiciar o transporte de solutos contra o gradiente através da membrana.
- A membrana mitocondrial interna é impermeável a NADH e $NAD^+$, mas equivalentes de NADH são movidos do citosol para a matriz por duas lançadeiras. Equivalentes de NADH deslocados para dentro pela lançadeira do malato-aspartato entram na cadeia respiratória no complexo I e produzem uma razão P/O de 2,5; aqueles movimentados para dentro pela lançadeira do glicerol-3-fosfato entram na ubiquinona e geram uma razão P/O de 1,5.

## 19.3 Regulação da fosforilação oxidativa

A fosforilação oxidativa produz a maior parte do ATP fabricado em células aeróbias. A oxidação completa de uma molécula de glicose a $CO_2$ produz 30 ou 32 ATP (Tabela 19-5). Em comparação, a glicólise sob condições anaeróbias (fermentação láctica) gera apenas dois ATP por glicose. Claramente, a evolução da fosforilação oxidativa proporcionou um grande aumento na eficiência energética do catabolismo. A oxidação completa até $CO_2$ do derivado do palmitato (16:0) ligado à coenzima A, que também ocorre na matriz mitocondrial, produz 108 ATP por palmitoil-CoA (ver Tabela 17-1). Um cálculo similar pode ser feito para a produção de ATP a partir da oxidação de cada um dos aminoácidos (Capítulo 18). Portanto, as vias oxidativas aeróbias que resultam na transferência de elétrons ao $O_2$ acompanhada da fosforilação oxidativa são responsáveis pela grande maioria do ATP produzido no catabolismo, de forma que é absolutamente essencial a regulação da produção de ATP pela fosforilação oxidativa, para se ajustar às necessidades celulares flutuantes da demanda por ATP.

**TABELA 19-5** Produção de ATP a partir da oxidação completa da glicose

| Processo | Produto direto | ATP final |
|---|---|---|
| Glicólise | 2 NADH (citosólico)<br>2 ATP | 3 ou 5*<br>2 |
| Oxidação do piruvato (dois por glicose) | 2 NADH (matriz mitocondrial) | 5 |
| Oxidação da acetil-CoA no ciclo do ácido cítrico (duas por glicose) | 6 NADH (matriz mitocondrial)<br>2 $FADH_2$<br>2 ATP ou 2 GTP | 15<br>3<br>2 |
| Produção total por glicose | | 30 ou 32 |

*O número depende do sistema de lançadeira a transferir equivalentes redutores para a mitocôndria.

## A fosforilação oxidativa é regulada pelas necessidades celulares de energia

A taxa de respiração (consumo de $O_2$) nas mitocôndrias é estritamente regulada, sendo limitada pela disponibilidade de ADP como substrato para a fosforilação. A dependência da taxa de consumo de $O_2$ em relação à disponibilidade do aceptor de $P_i$ ADP (Figura 19-20b), o **controle pelo aceptor** da respiração, pode ser notável. Em alguns tecidos animais, a **razão do controle pelo aceptor**, a razão entre a taxa máxima de consumo de $O_2$ induzida por ADP e a taxa basal na ausência de ADP, é de pelo menos 10.

A concentração intracelular de ADP é uma medida do estado energético das células. Outra medida relacionada é a **razão massa-ação** do sistema ATP-ADP, [ATP]/([ADP][$P_i$]). Normalmente essa razão é muito alta, de forma que o sistema ATP-ADP está quase totalmente fosforilado. Quando aumenta a taxa de algum processo que requer energia (p. ex., a síntese de proteína), também aumenta a taxa de quebra de ATP em ADP e $P_i$, baixando a razão massa-ação. Com mais ADP disponível para a fosforilação oxidativa, a taxa da respiração aumenta, causando a regeneração do ATP. Isso continua até que a razão massa-ação retorne ao seu nível normal alto, no qual a respiração pontual diminui novamente. A velocidade de oxidação de combustíveis celulares é regulada com tal sensibilidade e precisão que a razão [ATP]/([ADP][$P_i$]) flutua apenas levemente na maioria dos tecidos, mesmo durante variações extremas na demanda de energia. Em resumo, o ATP é formado exatamente tão rápido quanto é usado nas atividades celulares que requerem energia.

## Uma proteína inibitória impede a hidrólise de ATP durante a hipoxia

A ATP-sintase já foi apresentada como uma bomba de prótons movida a ATP (ver Figura 11-39), catalisando o reverso da síntese de ATP. Quando uma célula está hipóxica (desprovida de oxigênio), como em um ataque cardíaco ou acidente vascular, a transferência de elétrons para o oxigênio fica mais lenta, da mesma forma que o bombeamento de prótons. A força próton-motriz em seguida colapsa. Nessas condições, a ATP-sintase poderia operar ao contrário, hidrolisando ATP para bombear prótons para fora e causando uma queda desastrosa nos níveis de ATP. Isso é impedido por um pequeno (84 aminoácidos) inibidor proteico, $IF_1$, que se liga simultaneamente a duas moléculas de ATP-sintase, inibindo sua atividade ATPásica (**Figura 19-33**). $IF_1$ é inibitório apenas na sua forma dimérica, a qual é favorecida em pHs menores do que 6,5. Em uma célula ávida por oxigênio, a principal fonte de ATP se torna a glicólise, e o ácido pirúvico ou láctico então formado diminui o pH no citosol e na matriz mitocondrial. Isso favorece a dimerização de $IF_1$, levando a uma inibição da atividade ATPásica da ATP-sintase e, portanto, impedindo a hidrólise fútil de ATP. Quando o metabolismo aeróbio recomeça, a produção de ácido pirúvico diminui, o pH do citosol aumenta, o dímero $IF_1$ é desestabilizado e a inibição da ATP-sintase é removida. $IF_1$ é uma entre um número crescente de proteínas conhecidas por serem intrinsecamente desorganizadas (p. 141); ela adquire uma conformação favorecida apenas quando interage com a ATP-sintase.

## A hipoxia leva à produção de ERO e a várias respostas adaptativas

Em células hipóxicas, existe um desequilíbrio entre a chegada de elétrons a partir da oxidação de combustíveis celulares na matriz mitocondrial e a transferência de elétrons para o oxigênio molecular, levando a uma maior formação

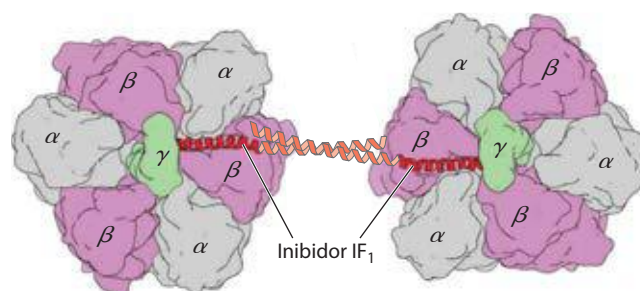



**FIGURA 19-33 Estrutura da $F_1$-ATPase bovina em um complexo com sua proteína regulatória $IF_1$.** (Derivada de PDB ID 1OHH) Duas moléculas de $F_1$ são aqui visualizadas como na Figura 19-25c. O inibidor $IF_1$ (em vermelho) se liga à interface $\alpha\beta$ das subunidades na conformação difosfato (ADP) ($\alpha$-ADP e $\beta$-ADP), congelando os dois complexos $F_1$ e, portanto, bloqueando a hidrólise (e síntese) de ATP. (As partes de $IF_1$ que não apresentaram resolução no cristal de $F_1$ são mostradas em vermelho-claro, na forma em que ocorrem em cristais de $IF_1$ isolados.) Este complexo é estável somente no baixo pH citosólico característico de células que estão produzindo ATP pela glicólise; quando o metabolismo aeróbio recomeça, o pH citosólico aumenta, o inibidor é desestabilizado e a ATP-sintase se torna ativa.

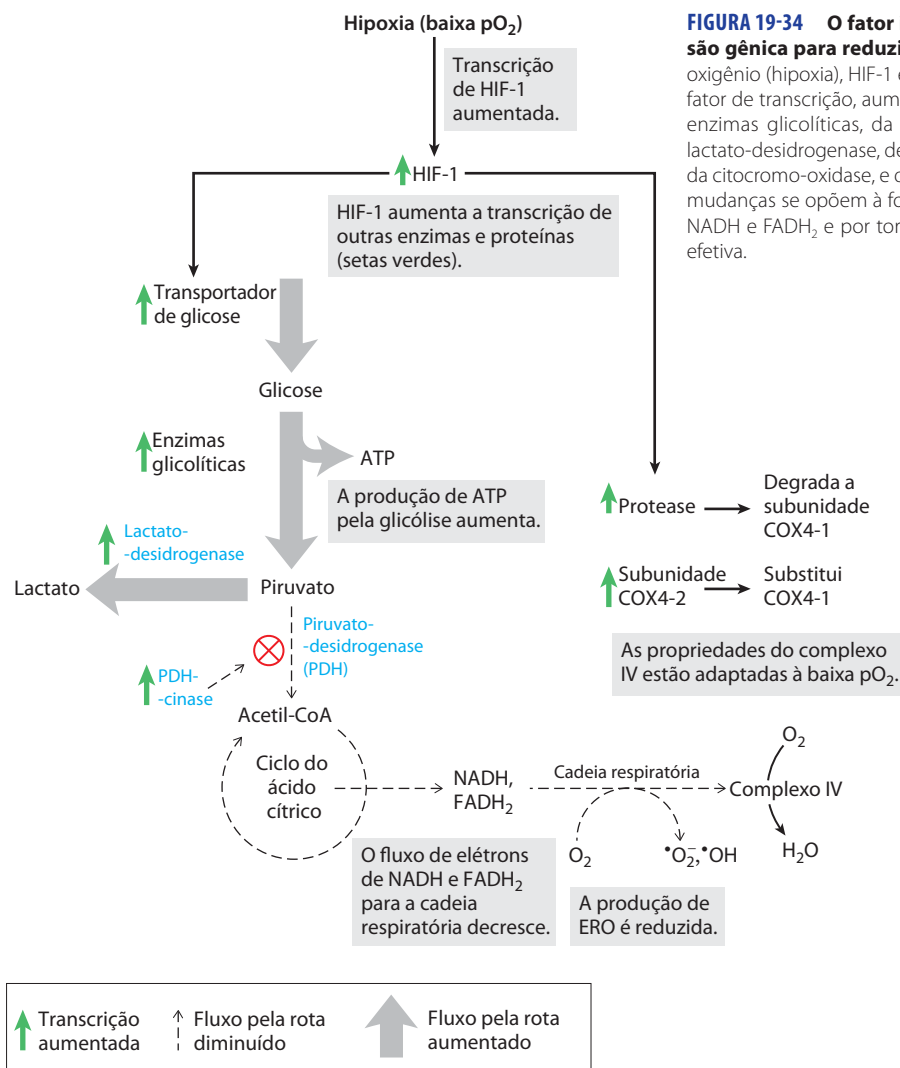



**FIGURA 19-34 O fator induzível por hipoxia (HIF-1) regula a expressão gênica para reduzir a formação de ERO.** Sob condições de pouco oxigênio (hipoxia), HIF-1 é sintetizado em quantidades maiores e age como fator de transcrição, aumentando a síntese do transportador de glicose, de enzimas glicolíticas, da piruvato-desidrogenase-cinase (PDH-cinase), da lactato-desidrogenase, de uma protease que degrada a subunidade COX4-1 da citocromo-oxidase, e da subunidade COX4-2 da citocromo-oxidase. Estas mudanças se opõem à formação de ERO, por diminuírem o suprimento de NADH e $FADH_2$ e por tornarem a citocromo-oxidase do complexo IV mais efetiva.

de espécies reativas de oxigênio. Além do sistema da glutationa-peroxidase (Figura 19-18), as células têm outras duas linhas de defesa contra as ERO (**Figura 19-34**). Uma é a regulação da piruvato-desidrogenase (PDH), a enzima que fornece acetil-CoA ao ciclo do ácido cítrico (Capítulo 16). Sob condições hipóxicas, a PDH-cinase fosforila a PDH mitocondrial, inativando-a e reduzindo o fornecimento de $FADH_2$ e NADH do ciclo do ácido cítrico para a cadeia respiratória. A segunda maneira de impedir a formação de ERO é a substituição de uma subunidade do complexo IV, conhecida como COX4-1, por outra subunidade, COX4-2, que é melhor ajustada a condições hipóxicas. Com COX4-1, as propriedades catalíticas do complexo IV são ótimas para a respiração em concentrações normais de oxigênio; com COX4-2, o complexo IV é otimizado para operar sob condições hipóxicas.

As mudanças na atividade da PDH e no conteúdo de COX4-2 do complexo IV são ambas mediadas por HIF-1, o fator induzível por hipoxia. O HIF-1 (outra proteína intrinsecamente desorganizada) acumula-se em células hipóxicas e, atuando como fator de transcrição, desencadeia um aumento na síntese de PDH-cinase, COX4-2 e uma protease que degrada COX4-1. Lembre-se de que HIF-1 também controla as mudanças no transporte da glicose e nas enzimas glicolíticas que produzem o efeito Pasteur (ver Quadro 14-1).

Quando esses mecanismos para lidar com as ERO são insuficientes, devido a mutações genéticas que afetam uma dessas proteínas protetoras ou sob condições de taxas muito altas de produção de ERO, a função mitocondrial fica comprometida. Acredita-se que o dano mitocondrial esteja envolvido no envelhecimento, no colapso cardíaco, em certos casos raros de diabetes (descritos a seguir) e em várias doenças genéticas de herança materna que afetam o sistema nervoso. ■

## As vias produtoras de ATP são coordenadamente reguladas

As principais vias catabólicas têm mecanismos regulatórios atrelados e coordenados, que lhes permitem funcionar juntas, em uma forma econômica e autorregulada, para produzir ATP e precursores biossintéticos. As concentrações relativas de ATP e ADP controlam não somente as taxas de transferência de elétrons e a fosforilação oxidativa, mas também as velocidades do ciclo do ácido cítrico, da oxidação do piruvato e da glicólise (**Figura 19-35**). Sempre que o consumo de

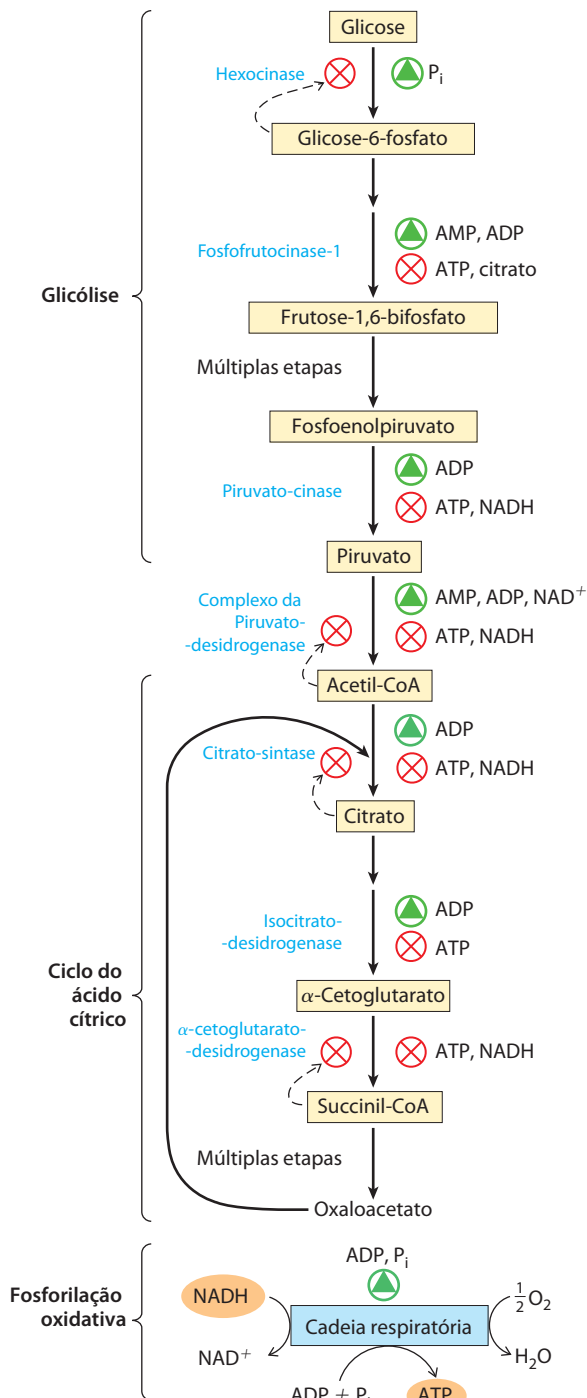



**FIGURA 19-35 Regulação das vias que produzem ATP.** Este diagrama mostra a regulação interconectada da glicólise, da oxidação do piruvato, do ciclo do ácido cítrico e da fosforilação oxidativa pelas concentrações relativas de ATP, ADP, AMP e por NADH. Alta [ATP] (ou baixa [ADP] e [AMP]) produz baixas velocidades de glicólise, oxidação do piruvato, oxidação do acetato via ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa. Todas as quatro vias são aceleradas quando o uso de ATP e a formação de ADP, AMP e $P_i$ aumentam. A interligação da glicólise e do ciclo do ácido cítrico pelo citrato, o qual inibe a glicólise, suplementa a ação do sistema de nucleotídeos da adenina. Além disto, níveis aumentados de NADH e de acetil-CoA também inibem a oxidação de piruvato a acetil-CoA, e uma alta razão [NADH]/[$NAD^+$] inibe as reações das desidrogenases do ciclo do ácido cítrico (ver Figura 16-19).

ATP aumenta, as velocidades da cadeia transportadora de elétrons e da fosforilação oxidativa aumentam. Simultaneamente, a velocidade de oxidação do piruvato pelo ciclo do ácido cítrico aumenta, elevando o fluxo de elétrons na cadeia respiratória. Esses eventos podem, por sua vez, evocar um aumento na velocidade da glicólise, aumentando a velocidade de formação de piruvato. Quando a conversão de ADP em ATP reduz a concentração de ADP, o controle pelo aceptor diminui a transferência de elétrons e, assim, a fosforilação oxidativa. A glicólise e o ciclo do ácido cítrico também têm sua velocidade reduzida, porque o ATP é um inibidor alostérico da enzima glicolítica fosfofrutocinase-1 (ver Figura 15-16) e da piruvato-desidrogenase (ver Figura 16-19).

A fosfofrutocinase-1 também é inibida por citrato, o primeiro intermediário do ciclo do ácido cítrico. Quando o ciclo estiver em "ponto morto", o citrato se acumula dentro das mitocôndrias, sendo então transportado para o citosol. Quando tanto as concentrações de ATP quanto de citrato aumentam, eles produzem um efeito alostérico conjunto da fosfofrutocinase-1, que é maior do que a soma dos seus efeitos individuais, reduzindo a glicólise.

### RESUMO 19.3 Regulação da fosforilação oxidativa

- A fosforilação oxidativa é regulada pelas demandas energéticas celulares. A [ADP] intracelular e a razão massa-ação [ATP]/([ADP][$P_i$] são medidas do estado energético de uma célula.
- Em células hipóxicas (desprovidas de oxigênio), um inibidor proteico bloqueia a hidrólise de ATP pela atividade reversa da ATP-sintase, impedindo uma queda drástica na [ATP].
- As respostas adaptativas à hipoxia, mediadas por HIF-1, reduzem a transferência de elétrons para a cadeia respiratória e modificam o complexo IV para que ele atue de maneira mais eficiente sob condições de baixo oxigênio.
- As concentrações de ATP e ADP estabelecem a velocidade de transporte de elétrons pela cadeia respiratória, por uma série de controles interconectados sobre a respiração, a glicólise e o ciclo do ácido cítrico.

## 19.4 Mitocôndrias na termogênese, na síntese de esteroides e na apoptose

Embora a produção de ATP seja o papel central da mitocôndria, esta organela tem outras funções que, em tecidos específicos ou sob condições específicas, também são essenciais. No tecido adiposo, as mitocôndrias geram calor para proteger órgãos vitais da baixa temperatura do ambiente. Nas glândulas suprarrenais e nas gônadas, as mitocôndrias são o local de síntese de hormônios esteroides, sendo, na maioria dos tecidos, participantes-chave na apoptose (morte celular programada).

### O desacoplamento em mitocôndrias do tecido adiposo marrom produz calor

Anteriormente foi mencionado que a respiração fica mais lenta quando a célula está adequadamente suprida com

ATP. Existe uma exceção notável e instrutiva a essa regra geral. A maioria dos mamíferos recém-nascidos, incluindo os humanos, tem um tipo de tecido adiposo chamado de **tecido adiposo marrom** (**TAM**; p. 944), no qual a oxidação de combustível serve não para produzir ATP, mas para gerar calor para manter o recém-nascido aquecido. Esse tecido adiposo especializado é marrom devido à presença de um grande número de mitocôndrias e, portanto, de uma alta concentração de citocromos, com grupos heme que são fortes absorvedores de luz visível.

As mitocôndrias dos adipócitos marrons são muito semelhantes às de outras células de mamíferos, exceto por terem uma proteína singular na membrana interna. A **termogenina**, também chamada de **proteína desacopladora 1**(o produto do gene *UCP1*), fornece uma via para os prótons retornarem à matriz sem passarem pelo complexo $F_oF_1$ (**Figura 19-36**). Como resultado desse curto-circuito de prótons, a energia de oxidação não é conservada pela formação de ATP, mas dissipada como calor, o que contribui para manter a temperatura corporal (ver Figura 23-16). Animais que hibernam também dependem da atividade de mitocôndrias desacopladas no TAM para gerar calor durante seus longos períodos adormecidos (ver Quadro 17-1). O papel da termogenina será esmiuçado quando for discutida a regulação da massa corporal no Capítulo 23 (p. 961-962).

## Oxigenases P-450 mitocondriais catalisam hidroxilações de esteroides

As mitocôndrias são o sítio das reações biossintéticas que produzem os hormônios esteroides, incluindo os hormônios sexuais, os glicocorticoides, os mineralocorticoides e o hormônio vitamina D. Esses compostos são sintetizados a partir do colesterol ou de um esterol relacionado, em uma série de hidroxilações catalisadas por enzimas da família **citocromo P-450**, todas tendo um grupo heme crítico (sua absorção a 450 nm dá o nome à família). Nas reações de hidroxilação, um átomo do oxigênio molecular é incorporado ao substrato e o segundo é reduzido a $H_2O$:

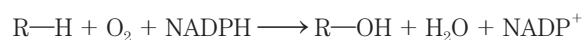
$$R—H + O_2 + NADPH \longrightarrow R—OH + H_2O + NADP^+$$

Existem dúzias de enzimas P-450, todas localizadas na membrana mitocondrial interna, com seus sítios catalíticos expostos à matriz. Células esteroidogênicas estão repletas de mitocôndrias especializadas na síntese de esteroides; as mitocôndrias geralmente são maiores do que aquelas em outros tecidos e têm membranas internas mais extensas e altamente convolutas (**Figura 19-37**).

**FIGURA 19-37 Mitocôndrias da glândula suprarrenal, especializadas na síntese de esteroides.** Conforme se vê nesta micrografia eletrônica de uma fina secção da glândula suprarrenal, as mitocôndrias são profusas e têm cristas extensas, proporcionando uma grande superfície para as enzimas P-450 da membrana interna.

A via do fluxo de elétrons no sistema P-450 mitocondrial é complexa, envolvendo uma flavoproteína e uma proteína ferro-enxofre, que carregam elétrons do NADPH ao heme P-450 (**Figura 19-38**). Todas as enzimas P-450 têm um heme que interage com $O_2$, e um sítio de ligação de substrato que confere especificidade.

Outra grande família de enzimas P-450 é encontrada no retículo endoplasmático (RE) de hepatócitos. Essas enzimas catalisam reações semelhantes às reações P-450 mitocondriais, mas seus substratos incluem uma ampla variedade de compostos hidrofóbicos, muitos dos quais são **xenobióticos** – compostos não encontrados na natureza, mas sintetizados industrialmente. As enzimas P-450 do RE têm especificidades muito amplas e que se sobrepõem. A hidroxilação dos compostos hidrofóbicos os torna mais solúveis em água e eles podem então ser liberados pelos rins e excretados na urina. Entre os substratos para estas oxigenases P-450 estão muitos remédios comumente utilizados. O metabolismo pelas enzimas P-450 limita o tempo de vida dos fármacos na corrente sanguínea e seus efeitos terapêuticos. Os humanos diferem em seus complementos genéticos de enzimas P-450 no RE e na extensão com a qual certas enzimas P-450 foram induzidas, como em um histórico de ingestão de álcool. Portanto, a princípio, a genética de uma pessoa e sua história pessoal poderiam embasar as determinações de doses terapêuticas de remédios; na prática, esse ajuste perfeito na dosagem ainda não é economicamente viável, mas pode vir a ser. ■

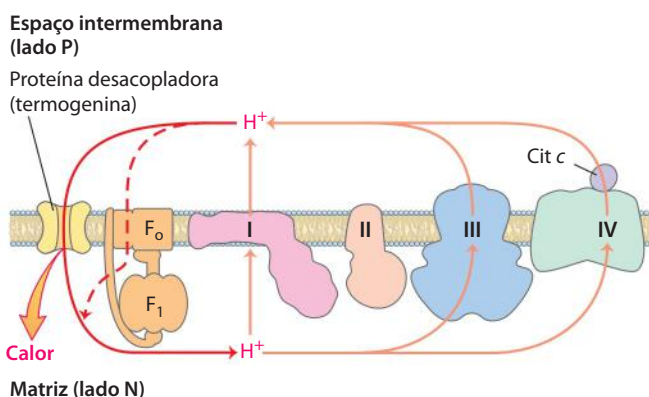



**FIGURA 19-36 Geração de calor por mitocôndrias desacopladas.** A proteína desacopladora (termogenina) nas mitocôndrias do tecido adiposo marrom, ao fornecer uma via alternativa para os prótons reentrarem na matriz mitocondrial, faz a energia conservada pelo bombeamento de prótons ser dissipada como calor.

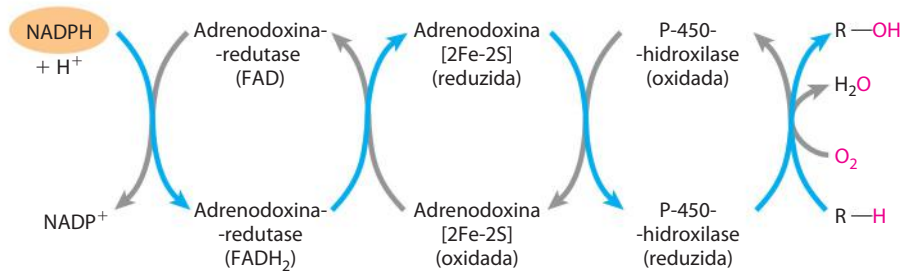



**FIGURA 19-38 Via do fluxo de elétrons nas reações do citocromo P-450 mitocondrial em glândula suprarrenal.** Dois elétrons são transferidos do NADPH à flavoproteína contendo FAD, adrenodoxina-redutase, que passa os elétrons, um de cada vez, à adrenodoxina, uma pequena proteína solúvel contendo 2Fe-2S. A adrenodoxina passa elétrons individuais à citocromo P-450-hidroxilase, que interage diretamente com $O_2$ e o substrato (R—H), para formar os produtos, $H_2O$ e R—OH.

## As mitocôndrias são de importância central para o início da apoptose

A **apoptose**, também chamada de **morte celular programada**, é um processo no qual células individuais morrem para o bem do organismo (p. ex., no transcorrer do desenvolvimento embrionário normal), e o organismo conserva os componentes moleculares da célula (aminoácidos, nucleotídeos e assim por diante). A apoptose pode ser desencadeada por um sinal externo, atuando em um receptor de membrana plasmática, ou por eventos internos, como lesão de DNA, infecção viral, estresse oxidativo pelo acúmulo de ERO ou outro estresse, como choque térmico.

As mitocôndrias desempenham um papel fundamental em desencadear a apoptose. Quando um estressor fornece o sinal para a morte da célula, a consequência inicial é um aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial externa, permitindo que o citocromo *c* escape do espaço intermembrana para o citosol (**Figura 19-39**). O aumento da permeabilidade é devido à abertura do **complexo do poro de transição de permeabilidade** (**CPTP**), proteína de múltiplas subunidades na membrana externa; sua abertura e seu fechamento são afetados por várias proteínas que estimulam ou suprimem a apoptose. Quando liberado no citosol, o citocromo *c* interage com monômeros da proteína **Apaf-1** (**protease fator 1 de ativação de apoptose**, de *apoptosis protease activating factor-1*), causando a formação de um **apoptossomo** composto por sete moléculas de Apaf-1 e sete moléculas de citocromo *c*. O apoptossomo proporciona a plataforma sobre a qual a protease procaspase-9 é ativada a caspase-9, membro de uma família de proteases altamente específicas (as **caspases**), envolvidas na apoptose. Elas todas apresentam um resíduo *Cys* crucial em seus sítios ativos, e todas clivam proteínas apenas no lado terminal carboxil dos resíduos de *Asp*, por isso o nome "caspases". A caspase-9 ativada inicia uma cascata de ativações proteolíticas, com uma caspase ativando uma segunda e, por sua vez, ativando uma terceira, e assim por

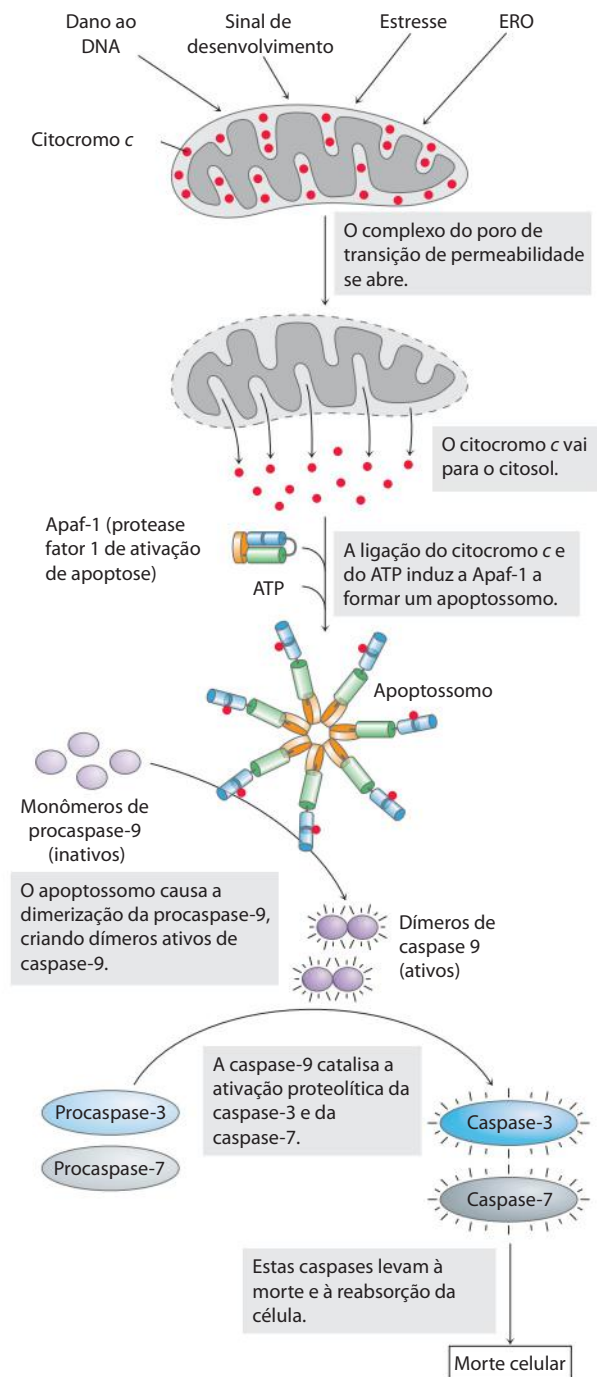



**FIGURA 19-39 O papel do citocromo *c* na apoptose.** O citocromo *c* é uma proteína mitocondrial pequena e solúvel, localizada no espaço intermembrana, que carrega elétrons entre o complexo III e o complexo IV durante a respiração. Em um papel completamente separado, como aqui esboçado, ele age como um gatilho para a apoptose, estimulando a ativação de uma família de proteases chamadas de caspases.

diante (ver Figura 12-52). (Esse papel do citocromo *c* na apoptose é um caso claro de "jornada dupla", onde uma proteína desempenha dois papéis muito diferentes na célula; ver Quadro 16-1.)

### RESUMO 19.4 Mitocôndrias na termogênese, na síntese de esteroides e na apoptose

- No tecido adiposo marrom de recém-nascidos, a transferência de elétrons está desacoplada da síntese de ATP, e a energia da oxidação de combustível é dissipada como calor.
- As etapas da reação de hidroxilação na síntese de hormônios esteroides em tecidos esteroidogênicos (glândula suprarrenal, gônadas, fígado e rim) ocorrem em mitocôndrias especializadas.
- O citocromo *c* mitocondrial liberado no citosol participa da ativação da caspase-9, uma das proteases envolvidas na apoptose.

## 19.5 Genes mitocondriais: suas origens e efeitos das mutações

As mitocôndrias contêm seus próprios genomas, uma molécula circular em fita dupla de DNA (DNAmt). Cada uma das centenas ou milhares de mitocôndrias em uma célula típica tem cerca de cinco cópias deste genoma. O cromossomo mitocondrial humano (**Figura 19-40**) contém 37 genes (16.569 pb), incluindo 13 que codificam subunidades de proteínas da cadeia respiratória (Tabela 19-6); os demais genes codificam moléculas de rRNA e tRNA, essenciais para a maquinaria sintetizadora de proteínas das mitocôndrias. A grande maioria das proteínas mitocondriais – cerca de 1.100 tipos diferentes – é codificada por genes nucleares, sintetizada nos ribossomos citoplasmáticos e então importada e organizada nas mitocôndrias (Capítulo 27).

### As mitocôndrias evoluíram a partir de bactérias endossimbióticas

A existência de DNA mitocondrial, ribossomos e tRNA dá suporte à hipótese da origem endossimbiótica das mitocôndrias (ver Figura 1-38), que sustenta que os primeiros organismos capazes de metabolismo aeróbio, incluindo a produção de ATP ligada à respiração, eram bactérias. Eucariotos primitivos que viviam anaerobiamente (por fermentação) adquiriram a capacidade de realizar a fosforilação oxidativa quando estabeleceram uma relação simbiótica com bactérias que viviam em seu citosol. Depois de muita evolução e do movimento de muitos genes bacterianos para o núcleo do hospedeiro eucarioto, as bactérias endossimbióticas ao final tornaram-se mitocôndrias.

Essa hipótese presume que bactérias primitivas de vida livre tinham a maquinaria enzimática para a fosforilação oxidativa e prevê que seus descendentes bacterianos modernos devem ter cadeias respiratórias muito semelhantes àquelas

(a)

(b)

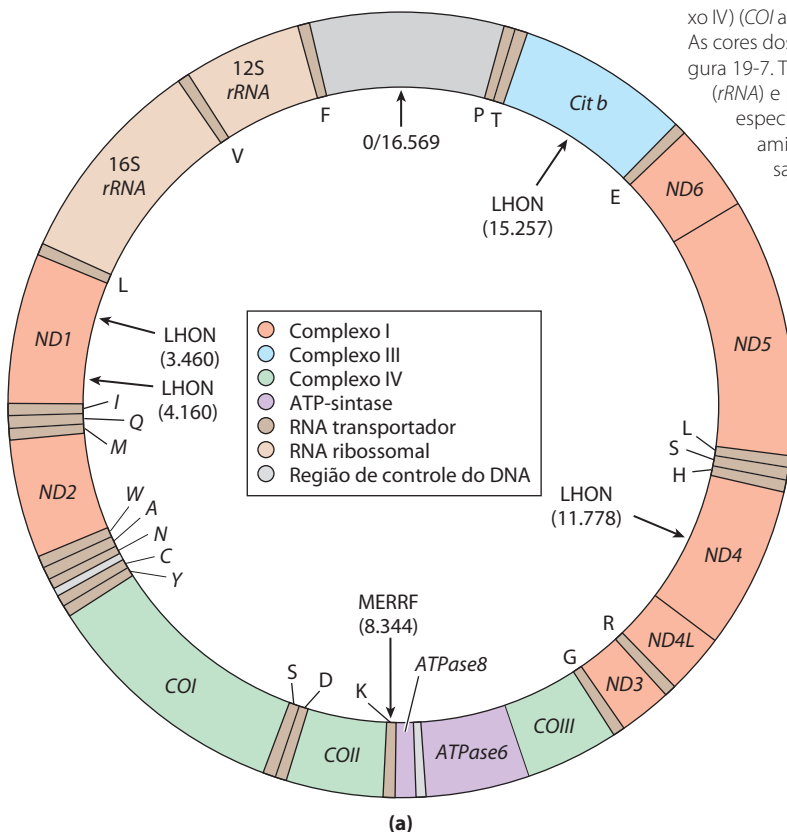



**FIGURA 19-40 Genes mitocondriais e mutações. (a)** Mapa do DNA mitocondrial humano, mostrando os genes que codificam proteínas do complexo I, a NADH-desidrogenase (*ND1* a *ND6*); o citocromo *b* do complexo III (*Cit b*); as subunidades da citocromo-oxidase (complexo IV) (*COI* a *COIII*); e as duas subunidades da ATP-sintase (*ATPase6* e *ATPase8*). As cores dos genes correspondem àquelas dos complexos mostrados na Figura 19-7. Também incluídos aqui estão os genes para os RNA ribossomais (*rRNA*) e para alguns RNA transportadores específicos de mitocôndria; a especificidade do tRNA é indicada pelos códigos de uma letra para os aminoácidos. As setas indicam as posições das mutações que causam a neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON) e a doença da epilepsia mioclônica e fibra vermelha rota (MERRF). Os números dentro dos parênteses indicam a posição dos nucleotídeos alterados (o nucleotídeo 1 está no topo do círculo e a numeração prossegue no sentido anti-horário). **(b)** Micrografia eletrônica de mitocôndria anormal do músculo de uma pessoa com MERRF, mostrando as inclusões de proteína paracristalina algumas vezes presentes nas mitocôndrias mutantes.

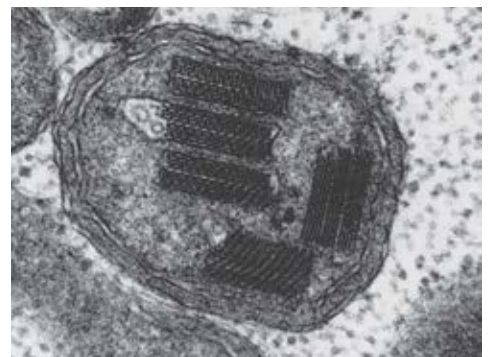



**TABELA 19-6** Proteínas respiratórias codificadas por genes mitocondriais em humanos

| Complexo | Número de subunidades | Número de subunidades codificadas por DNA mitocondrial |
|---|---|---|
| I NADH-desidrogenase | 43 | 7 |
| II Succinato-desidrogenase | 4 | 0 |
| III Ubiquinona:citocromo *c*-oxidorredutase | 11 | 1 |
| IV Citocromo-oxidase | 13 | 3 |
| V ATP-sintase | 8 | 2 |

dos eucariotos modernos. Eles têm. As bactérias aeróbias realizam a transferência de elétrons associada ao NAD de substratos para o $O_2$, acoplada à fosforilação de ADP citosólico. As desidrogenases estão localizadas no citosol bacteriano, e a cadeia respiratória na membrana plasmática. Os carregadores de elétrons transportam prótons para fora através da membrana plasmática, à medida que elétrons são transferidos para o $O_2$. Bactérias como *Escherichia coli* têm complexos $F_oF_1$ em suas membranas plasmáticas; a porção $F_1$ se projeta para o citosol e catalisa a síntese de ATP a partir de ADP e $P_i$, à medida que os prótons fluem de volta para a célula por meio do canal de prótons de $F_o$.

A extrusão de prótons através da membrana plasmática bacteriana associada à respiração também fornece a força propulsora para outros processos. Certos sistemas de transporte bacterianos permitem a absorção de nutrientes extracelulares (p. ex., lactose) contra um gradiente de concentração, em simporte com prótons (ver Figura 11-41). E o movimento rotatório de flagelos bacterianos é proporcionado por "turbinas de prótons", motores moleculares de rotação impulsionados não por ATP, mas diretamente pelo potencial eletroquímico transmembrana gerado pelo bombeamento de prótons associado à respiração (**Figura 19-41**). Parece provável que o mecanismo quimiosmótico tenha evoluído cedo, antes do surgimento dos eucariotos.

**FIGURA 19-41 Rotação de flagelos bacterianos pela força próton-motriz.** O eixo e os anéis na base do flagelo constituem um motor rotatório que tem sido chamado de "turbina de prótons". Os prótons ejetados pela transferência de elétrons fluem de volta para a célula pela turbina, causando a rotação do eixo do flagelo. Este movimento difere fundamentalmente do movimento de músculos e de flagelos e cílios de eucariotos, para os quais a hidrólise de ATP é a fonte de energia.

## Mutações em DNA mitocondrial acumulam-se ao longo de toda a vida do organismo

A cadeia respiratória é o principal produtor de espécies reativas de oxigênio na célula, de forma que os conteúdos mitocondriais, incluindo o genoma mitocondrial, sofrem a maior exposição e o maior dano por ERO. Além disso, o sistema mitocondrial de replicação de DNA é menos eficiente do que o sistema nuclear em corrigir erros feitos durante a replicação e em reparar dano ao DNA. Como consequência destes dois fatores, defeitos no DNAmt se acumulam ao longo do tempo. Uma das teorias do envelhecimento é a de que o acúmulo gradual de defeitos com o aumento da idade é a causa primária de muitos dos "sintomas" de envelhecimento, que incluem, por exemplo, o enfraquecimento progressivo dos músculos esquelético e cardíaco.

Uma característica singular da herança mitocondrial é a variação entre células individuais e entre um organismo e outro nos efeitos de uma mutação do DNAmt. Uma célula típica tem centenas ou milhares de mitocôndrias, cada uma com múltiplas cópias do seu próprio genoma (**Figura 19-42**). Os animais herdam essencialmente todas as suas mitocôndrias da mãe. Os ovos são grandes e contêm $10^5$ ou $10^6$ mitocôndrias, mas os espermatozóides são bem menores e contêm bem menos mitocôndrias – talvez de 100 a 1.000.

**FIGURA 19-42 Células individuais contêm muitas mitocôndrias.** Uma célula animal típica tem centenas ou milhares de mitocôndrias, uma fração das quais pode conter genomas com mutações que afetam a função mitocondrial. Esta célula epitelial de rim ovino foi cultivada em laboratório, fixada e então corada com sondas fluorescentes, que mostram as mitocôndrias em dourado, os microfilamentos de actina em vermelho e o núcleo em verde quando observada em microscópio de fluorescência.

Além disso, existe um mecanismo ativo que marca as mitocôndrias derivadas dos espermatozóides para a degradação no ovo fertilizado. Logo depois da fertilização, fagossomos maternos migram para o local de entrada dos espermatozóides, engolfam suas mitocôndrias e as degradam.

Suponha que, em um organismo feminino, um dano a um genoma mitocondrial ocorra em uma célula germinativa da qual se desenvolvem os oócitos, de forma que a célula germinativa contenha principalmente mitocôndrias com os genes do tipo selvagem (sem a mutação), mas uma mitocôndria com um gene mutante. No decurso da maturação do oócito, à medida que essa célula germinativa e seus descendentes dividem-se repetidamente, a mitocôndria com defeito se replica, e os membros de sua progênie, todos defeituosos, são aleatoriamente distribuídos entre as células-filhas. Em certo ponto, o óvulo maduro contém diferentes proporções da mitocôndria defeituosa. Quando um óvulo é fertilizado e sofre as muitas divisões do desenvolvimento embrionário, as células somáticas resultantes diferem na proporção de mitocôndrias mutantes (**Figura 19-43a**). Essa **heteroplasmia** (ao contrário da **homoplasmia**, na qual todo o genoma mitocondrial em toda a célula é o mesmo) resulta em fenótipos mutantes, com graus variáveis de gravidade. Células (e tecidos) que contêm principalmente mitocôndrias do tipo selvagem (sem mutação) têm o fenótipo normal; elas são essencialmente normais. Outras células heteroplásmicas terão fenótipos intermediários, algumas sendo quase normais, outras (com grande proporção de mitocôndrias mutantes) anormais (Figura 19-41b). Se o fenótipo anormal estiver associado a alguma doença (ver a seguir), pessoas com a mesma mutação de DNAmt podem apresentar sintomas da doença com diferente gravidade – dependendo do número e da distribuição das mitocôndrias afetadas.

## Algumas mutações nos genomas mitocondriais causam doenças

Um número crescente de doenças humanas foi atribuído a mutações nos genes mitocondriais que reduzem a capacidade da célula de produzir ATP. Alguns tipos de células e de tecidos – neurônios, miócitos dos músculos cardíaco e esquelético e células $\beta$ do pâncreas – são menos capazes do que outros de tolerar uma produção reduzida de ATP, sendo, portanto, mais afetados por mutações nas proteínas mitocondriais.

Um grupo de doenças genéticas conhecidas como **encefalomiopatias mitocondriais** afeta principalmente o encéfalo e o músculo esquelético. Essas doenças são invariavelmente herdadas da mãe, porque, conforme observado anteriormente, todas as mitocôndrias de um embrião em desenvolvimento derivam do óvulo. A doença rara **neuropatia óptica hereditária de Leber** (**LHON**, de *Leber´s hereditary optic neuropathy*) afeta o sistema nervoso central, incluindo os nervos ópticos, causando a perda bilateral da visão em jovens adultos. Uma única mudança em uma base no gene mitocondrial *ND4* (Figura 19-40a) muda um resíduo de Arg para um resíduo de His em um polipeptídeo do complexo I, e o resultado são mitocôndrias parcialmente defeituosas na transferência de elétrons do NADH à ubiquinona. Embora essas mitocôndrias possam produzir algum ATP pela transferência de elétrons a partir do succinato, elas aparentemente não suprem ATP

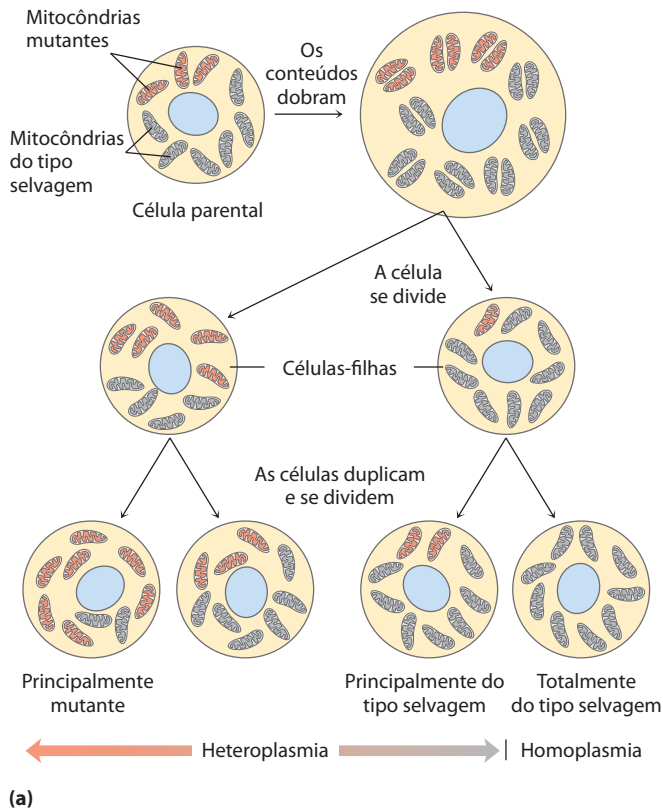
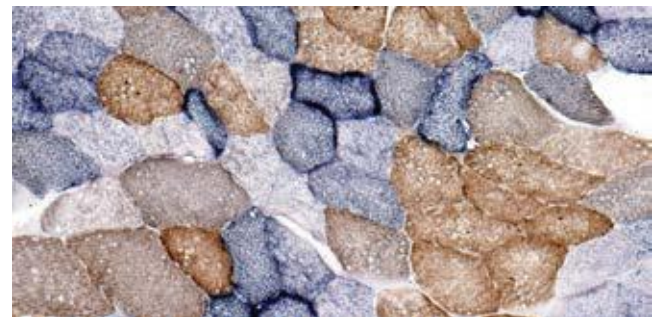



**FIGURA 19-43 Heteroplasmia em genomas mitocondriais. (a)** Quando um óvulo maduro é fertilizado, todas as mitocôndrias na célula diploide resultante (zigoto) são de origem materna; nenhuma vem do espermatozoide. Se uma fração das mitocôndrias maternais tem um gene mutante, a distribuição aleatória das mitocôndrias durante divisões celulares subsequentes produz algumas células-filhas com predomínio de mitocôndrias mutantes, algumas contendo principalmente mitocôndrias do tipo selvagem e algumas intermediárias; assim, as células-filhas mostram graus variáveis de heteroplasmia. **(b)** Diferentes graus de heteroplasmia produzem diferentes fenótipos celulares. Este corte do tecido muscular humano é de uma pessoa com citocromo-oxidase defeituosa. As células foram coradas para tornar as células do tipo selvagem azuis e as células com citocromo-oxidase defeituosa marrons. Conforme mostra a micrografia, células diferentes no mesmo tecido são afetadas em graus diferentes pela mutação mitocondrial.

suficiente para sustentar o metabolismo muito ativo dos neurônios. O resultado é a lesão do nervo óptico, levando à cegueira. Uma única mudança em uma base do gene mitocondrial do citocromo *b*, um componente do complexo III, também produz LHON, demonstrando que a patologia resulta de uma redução geral da função mitocondrial, não especificamente de um defeito na transferência de elétrons pelo complexo I.

Uma mutação (em *ATP6*) que afeta o poro de prótons na ATP-sintase leva a baixas velocidades de síntese de ATP, enquanto mantém a cadeia respiratória intacta. O estresse oxidativo devido ao suprimento continuado de elétrons do NADH aumenta a produção de ERO, e o dano às mitocôndrias causado por essas espécies estabelece um ciclo vicioso. Uma a cada duas pessoas com este gene mutante morre dias ou meses após seu nascimento.

A **doença da epilepsia mioclônica e fibra vermelha rota** (**MERRF**, de *myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease*) é causada por uma mutação no gene mitocondrial que codifica um tRNA específico para lisina ($tRNA^{Lys}$). Essa doença, caracterizada por contrações musculares abruptas involuntárias, aparentemente resulta da produção defeituosa de várias das proteínas que requerem tRNA mitocondrial para suas sínteses. Fibras musculares esqueléticas de pessoas com MERRF têm mitocôndrias com formato anormal, que às vezes contêm estruturas paracristalinas (Figura 19-40b). Acredita-se que outras mutações nos genes mitocondriais sejam responsáveis pela fraqueza muscular progressiva que caracteriza a miopatia mitocondrial e pela hipertrofia e deterioração do músculo cardíaco na miocardiopatia hipertrófica. De acordo com uma hipótese sobre as mudanças progressivas que acompanham o envelhecimento, o acúmulo de mutações no DNAmt durante uma vida de exposição a agentes capazes de danificar o DNA, como $^{\bullet}O_2^-$, resulta em mitocôndrias que não podem suprir ATP suficiente para o funcionamento celular normal. Doenças mitocondriais também podem resultar de mutações em qualquer dos ~1.100 genes nucleares que codificam proteínas mitocondriais. ■

**FIGURA 19-44 A fosforilação oxidativa defeituosa em células β pancreáticas bloqueia a secreção de insulina.** Na situação normal destacada aqui, quando a glicose sanguínea aumenta, a produção de ATP nas células β aumenta. O ATP, bloqueando canais de $K^+$, despolariza a membrana plasmática e, assim, abre os canais de $Ca^{2+}$ controlados por voltagem. O influxo de $Ca^{2+}$ resultante desencadeia a exocitose de vesículas secretoras contendo insulina, liberando este hormônio. Quando a fosforilação oxidativa em células β é defeituosa, a [ATP] nunca é suficiente para desencadear este processo e a insulina não é liberada.

## O diabetes pode resultar de defeitos nas mitocôndrias de células β pancreáticas

O mecanismo que regula a liberação de insulina de células β pancreáticas está atrelado à concentração de ATP nestas células. Quando a glicose sanguínea está alta, as células β absorvem glicose e a oxidam por glicólise e ciclo do ácido cítrico, aumentando a [ATP] acima de um nível crítico (**Figura 19-44**). Quando a [ATP] excede este limiar, um canal de $K^+$ sensível a ATP na membrana plasmática se fecha, despolarizando a membrana e desencadeando a liberação de insulina (ver Figura 23-27). As células β pancreáticas com defeitos na fosforilação oxidativa não podem aumentar a [ATP] acima desse limiar, e a falha resultante na liberação de insulina efetivamente produz o diabetes. Por exemplo, defeitos nos genes para glicocinase, a isoenzima hexocinase IV presente em células β, levam a uma forma rara de diabetes, MODY2 (ver Quadro 15-3); a baixa atividade da glicocinase impede a produção de [ATP] acima do valor crítico, bloqueando a secreção de insulina. Mutações nos genes mitocondriais de $tRNA^{Lys}$ e $tRNA^{Leu}$ também comprometem a produção mitocondrial de ATP, e o diabetes melito tipo 2 é comum entre pessoas com esses defeitos (embora esses casos constituam uma fração muito pequena de todos os casos de diabetes).

Quando a nicotinamida-nucleotídeo-transidrogenase, que é parte da defesa mitocondrial contra ERO (ver Figura 19-18), é geneticamente defeituosa, o acúmulo de ERO danifica as mitocôndrias, diminuindo a produção de ATP e bloqueando a liberação de insulina pelas células β (Figura 19-44). Os danos causados pelas ERO, incluindo dano ao DNAmt, também podem estar por trás de outras doenças humanas; existe alguma evidência de seu envolvimento nas doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington e na falência cardíaca, assim como no envelhecimento. ■

## RESUMO 19.5 Genes mitocondriais: suas origens e efeitos das mutações

- Uma pequena proporção das proteínas mitocondriais humanas, 13 ao todo, é codificada pelo genoma mitocondrial e sintetizada nas mitocôndrias. Cerca de 1.100 proteínas mitocondriais são codificadas nos genes nucleares e importadas para as mitocôndrias depois de suas sínteses.
- As mitocôndrias surgiram de bactérias aeróbias que entraram em relação endossimbiótica com eucariotos ancestrais.

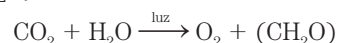
- As mutações no genoma mitocondrial se acumulam ao longo da vida do organismo. Mutações nos genes que codificam os componentes da cadeia respiratória, da ATP-sintase e do sistema de captura de ERO e mesmo dos genes de tRNA podem causar uma variedade de doenças humanas que, com frequência, afetam mais gravemente o músculo, o coração, as células $\beta$ pancreáticas e o encéfalo.

# FOTOSSÍNTESE: CAPTURANDO ENERGIA LUMINOSA

Agora será apresentada outra sequência de reações na qual o fluxo de elétrons está acoplado à síntese de ATP: a fosforilação utilizando a energia da luz. A captura da energia solar por organismos fotossintéticos e sua conversão na energia química de compostos orgânicos reduzidos é a fonte elementar de quase toda a energia biológica da Terra. Organismos fotossintéticos e heterotróficos vivem em um equilíbrio de estado estacionário na biosfera (**Figura 19-45**). Os organismos fotossintéticos capturam a energia solar e formam ATP e NADPH, usados como fonte de energia para sintetizar carboidratos e outros compostos orgânicos a partir de $CO_2$ e $H_2O$; simultaneamente, eles liberam $O_2$ na atmosfera. Heterótrofos aeróbios (p. ex. humanos, assim como plantas durante períodos escuros) usam o $O_2$ formado desse modo para degradar os produtos orgânicos ricos em energia da fotossíntese em $CO_2$ e $H_2O$, gerando ATP. O $CO_2$ retorna à atmosfera, para ser usado novamente pelos organismos fotossintéticos. Assim, a energia solar fornece a força propulsora para a ciclagem contínua de $CO_2$ e $O_2$ na biosfera, fornecendo também os substratos reduzidos – combustíveis como a glicose – dos quais dependem os organismos não fotossintéticos.

A fotossíntese ocorre em uma variedade de bactérias e em eucariotos unicelulares (algas), assim como em plantas. Embora o processo nesses organismos difira nos detalhes, os mecanismos básicos são notavelmente semelhantes, e boa parte da compreensão da fotossíntese em plantas vasculares deriva do estudo de organismos mais simples. A equação geral da fotossíntese em plantas descreve uma reação de oxidação-redução na qual $H_2O$ doa elétrons (como hidrogênio) para a redução de $CO_2$ a carboidrato ($CH_2O$):

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{luz}} O_2 + (CH_2O)$$

**FIGURA 19-45 A energia solar como a fonte elementar de toda a energia biológica.** Os organismos fotossintéticos utilizam a energia da luz do sol para produzir glicose e outros produtos orgânicos, os quais as células heterotróficas usam como fontes de energia e de carbono.

## 19.6 Características gerais da fotofosforilação

Ao contrário do NADH (o principal doador de elétrons na fosforilação oxidativa), a $H_2O$ é uma fraca doadora de elétrons; o seu potencial de redução padrão é de 0,816 V, comparado com −0,320 V para NADH. A fotofosforilação difere da fosforilação oxidativa por requerer o acréscimo de energia na forma de luz para *criar* um bom doador de elétrons e um bom aceptor de elétrons (ver Figura 19-1). Na fotofosforilação, os elétrons fluem por uma série de carregadores ligados a membranas, incluindo citocromos, quinonas e proteínas ferro-enxofre, enquanto prótons são bombeados através de uma membrana para criar um potencial eletroquímico. A transferência de elétrons e o bombeamento de prótons são catalisados por complexos de membrana análogos em estrutura e função ao complexo III das mitocôndrias. O potencial eletroquímico que eles produzem é a força propulsora para a síntese de ATP a partir de ADP e $P_i$, catalisada por um complexo de ATP-sintase ligado à membrana, muito similar àquele de mitocôndrias e bactérias.

A fotossíntese em plantas engloba dois processos: as **reações dependentes de luz**, ou **reações luminosas**, que ocorrem apenas quando as plantas são iluminadas, e as **reações de assimilação de carbono** (ou **reações de fixação de carbono**), algumas vezes equivocadamente chamadas de reações de fase escura, propiciadas pelos produtos das reações de luz (**Figura 19-46**). Nas reações luminosas, a clorofila e outros pigmentos de células fotossintéticas absorvem energia luminosa e a conservam como ATP e NADPH; simultaneamente, $O_2$ é liberado. Nas reações de assimilação de carbono, ATP e NADPH são usados para reduzir $CO_2$ para formar trioses-fosfato, amido e sacarose e outros produtos deles derivados. Neste capítulo, serão apresentadas somente as reações dependentes de luz que levam à síntese de ATP e NADPH. A redução do $CO_2$ é descrita no Capítulo 20.

### A fotossíntese em plantas ocorre nos cloroplastos

Em células eucarióticas fotossintéticas, tanto as reações dependentes de luz quanto as de assimilação de carbono ocorrem nos cloroplastos (**Figura 19-47**), organelas intracelulares variáveis em forma e geralmente com poucos micrômetros de diâmetro. Da mesma forma que as mitocôndrias, eles são circundados por duas membranas, uma membrana externa, permeável a pequenas moléculas e íons, e uma membrana interna, que delimita o compartimento interno. Esse compartimento contém muitas vesí-

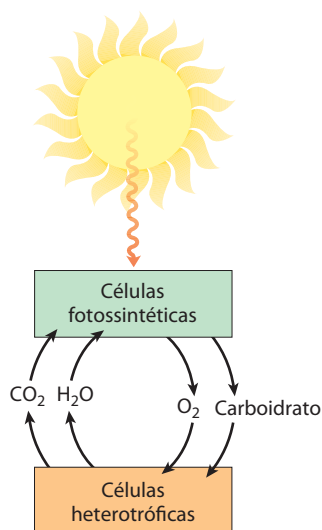
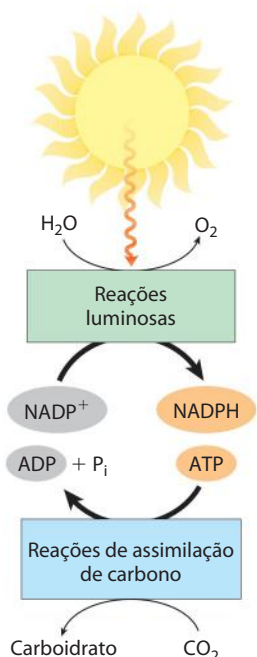



**FIGURA 19-46 As reações luminosas da fotossíntese geram NADPH e ATP ricos em energia, às custas da energia solar.** NADPH e ATP são usados nas reações de assimilação de carbono, que ocorrem na luz ou na escuridão, para reduzir $CO_2$ para formar trioses e compostos mais complexos (como glicose) derivados das trioses.

culas ou sacos achatados, circundados por membranas, os **tilacoides**, comumente arranjados em pilhas chamadas de **grana** (Figura 19-47b). Embebidos nas membranas tilacoides (comumente chamadas de **lamelas**) estão os pigmentos fotossintéticos e os complexos enzimáticos que realizam as reações luminosas e a síntese de ATP. O **estroma** (a fase aquosa delimitada pela membrana interna) contém a maioria das enzimas necessárias para as reações de assimilação de carbono.

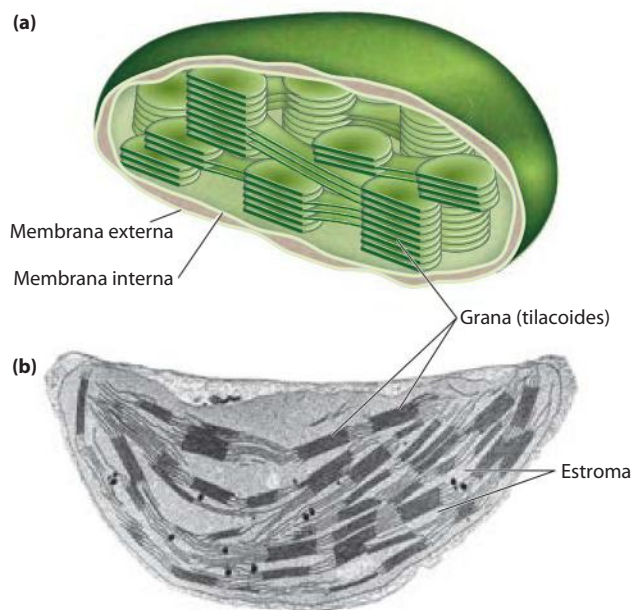
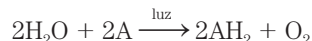
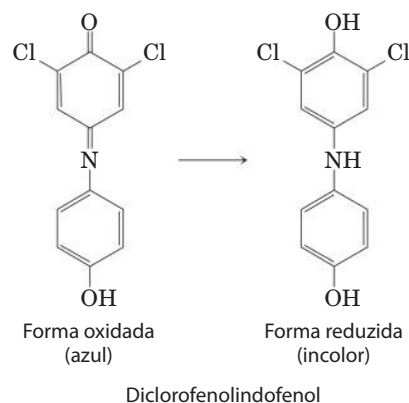
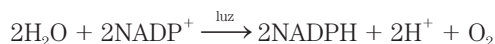



**FIGURA 19-47 Cloroplasto. (a)** Diagrama esquemático. **(b)** Micrografia eletrônica em alto aumento, mostrando os grana, pilhas de membranas tilacoides.

## A luz impulsiona o fluxo de elétrons nos cloroplastos

Em 1937, Robert Hill verificou que, quando extratos de folhas contendo cloroplastos eram iluminados, eles (1) liberavam $O_2$ e (2) reduziam um aceptor de elétrons não biológico adicionado ao meio, de acordo com a **reação de Hill**:

$$2H_2O + 2A \xrightarrow{\text{luz}} 2AH_2 + O_2$$

onde A é o aceptor artificial de elétrons, ou o **reagente de Hill**. Um reagente de Hill, o corante 2,6-diclorofenolindofenol, é azul quando oxidado (A) e incolor quando reduzido ($AH_2$), tornando a reação fácil de ser acompanhada:

Quando um extrato foliar suplementado com o corante foi iluminado, o corante azul se tornou incolor e $O_2$ foi liberado. No escuro, nem a liberação de $O_2$ e nem a redução do corante aconteceram. Essa foi a primeira evidência de que a energia luminosa absorvida faz os elétrons fluirem da água para um aceptor de elétrons. Além disso, Hill constatou que o $CO_2$ não era necessário e nem reduzido a uma forma estável sob essas condições; a liberação de $O_2$ podia ser dissociada da redução do $CO_2$. Vários anos depois, Severo Ochoa mostrou que o $NADP^+$ é o aceptor biológico de elétrons nos cloroplastos, de acordo com a equação

$$2H_2O + 2NADP^+ \xrightarrow{\text{luz}} 2NADPH + 2H^+ + O_2$$

Para compreender esse processo fotoquímico, precisa-se primeiro considerar o tópico mais geral dos efeitos da absorção de luz na estrutura molecular.

## RESUMO 19.6 Características gerais da fotofosforilação

- A fotossíntese ocorre nos cloroplastos de algas e plantas, estruturas delimitadas por membranas duplas e preenchidas com discos membranosos empilhados (membranas tilacoides), que contêm a maquinaria fotossintética.
- As reações luminosas da fotossíntese são aquelas que dependem diretamente da absorção de luz; a fotoquímica resultante retira elétrons de $H_2O$ e direciona-os por

meio de uma série de carregadores ligados à membrana, produzindo NADPH e ATP.

- As reações de assimilação de carbono da fotossíntese reduzem o $CO_2$ com os elétrons do NADPH e com a energia do ATP, formando trioses, hexoses e uma ampla variedade de carboidratos delas derivados.

## 19.7 Absorção de luz

A luz visível é a radiação eletromagnética de comprimentos de onda de 400 a 700 nm, uma pequena parte do espectro eletromagnético (**Figura 19-48**), variando do violeta ao vermelho. A energia de um único **fóton** (um quantum de luz) é maior na extremidade violeta do espectro do que na extremidade vermelha; comprimentos de onda mais curtos (e com maior frequência) correspondem a uma maior energia. A energia, $E$, de um único fóton de luz visível é dada pela equação de Planck:

$$E = h\nu = hc/\lambda$$

onde $h$ é a constante de Planck ($6{,}626 \times 10^{-34}$ J · s), $\nu$ é a frequência da luz em ciclos/s, $c$ é a velocidade da luz ($3{,}00 \times 10^8$ m/s), e $\lambda$ é o comprimento de onda em metros. A energia de um fóton de luz visível varia de 150 kJ/einstein para luz vermelha até ~300 kJ/einstein para luz violeta.

**PROBLEMA RESOLVIDO 19-3** **A energia de um fóton**

A luz utilizada pelas plantas vasculares para a fotossíntese tem um comprimento de onda de cerca de 700 nm. Calcule a energia em um "mol" de fótons (um einstein) de luz desse comprimento de onda e compare com a energia necessária para sintetizar um mol de ATP.

**Solução:** A energia em um único fóton é dada pela equação de Planck. Em um comprimento de onda de $700 \times 10^{-9}$ m, a energia de um fóton é

$$E = hc/\lambda = \frac{[(6{,}626 \times 10^{-34}\ \text{J}\cdot\text{s})(3{,}00 \times 10^{8}\ \text{m/s})]}{(7{,}00 \times 10^{-7}\ \text{m})} = 2{,}84 \times 10^{-19}\ \text{J}$$

Um einstein de luz é o número de Avogadro ($6{,}022 \times 10^{23}$) de fótons; assim, a energia de um einstein de fótons a 700 nm é dada por

$$(2{,}84 \times 10^{-19}\ \text{J/fóton})\ (6{,}022 \times 10^{23}\ \text{fótons/einstein}) = 17{,}1 \times 10^{4}\ \text{J/einstein} = 171\ \text{kJ/einstein.}$$

Assim, um "mol" de fótons de luz vermelha tem cerca de cinco vezes a energia necessária para produzir um mol de ATP a partir de ADP e $P_i$ (30,5 kJ/mol).

Quando um fóton é absorvido, um elétron na molécula que absorve (cromóforo) é elevado para um nível de maior energia. Esse é um evento "tudo ou nada"; para ser absorvido, o fóton precisa conter a quantidade de energia (um **quantum**) que se ajusta exatamente à energia da transição eletrônica. Uma molécula que absorve um fóton está em **estado excitado**, que geralmente é instável. Um elétron elevado a um orbital de maior energia em geral retorna rapidamente a seu orbital de menor energia; a molécula excitada decai para o **estado basal** estável, liberando o quantum absorvido na forma de luz ou calor ou utilizando-o para realizar trabalho químico. A emissão de luz que acompanha o decaimento de moléculas excitadas (chamado de **fluorescência**) está sempre em um comprimento de onda maior (menor energia) do que aquele da luz absorvida (ver Quadro 12-3). Um modo alternativo de decaimento importante na fotossíntese envolve a transferência direta de energia de excitação de uma molécula excitada para uma molécula vizinha. Da mesma forma que o fóton é um quantum de energia luminosa, o **éxciton** é o quantum de energia passada de uma molécula excitada para outra molécula, no processo chamado de **transferência de éxciton**.

### As clorofilas absorvem energia luminosa para a fotossíntese

Os pigmentos absorvedores de luz mais importantes nas membranas tilacoides são as **clorofilas**, pigmentos verdes com estruturas policíclicas, planares, lembrando a protoporfirina da hemoglobina (ver Figura 5-1), exceto que o $Mg^{2+}$, e não o $Fe^{2+}$, ocupa a posição central (**Figura 19-49**). Os quatro átomos de nitrogênio orientados para dentro da clo-

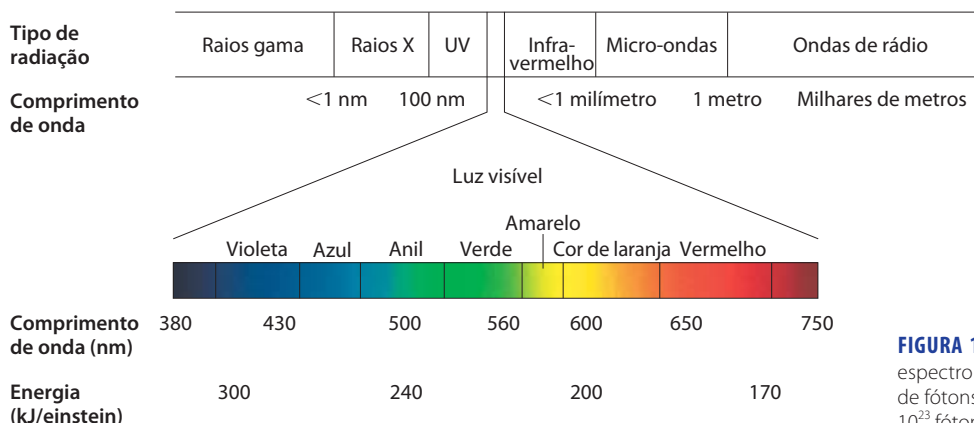



**FIGURA 19-48 Radiação eletromagnética.** O espectro da radiação eletromagnética e a energia de fótons na faixa do visível. Um einstein é $6{,}022 \times 10^{23}$ fótons.

(a)

CHO em clorofila *b*

Em bacterioclorofila

Ligação saturada em bacterioclorofila

Cadeia lateral de fitol

Clorofila *a*

(b)

Em ficocianobilina

Ligação insaturada em ficocianobilina

Ficoeritrobilina

(c)

*β*-caroteno

(d)

Luteína (xantofila)

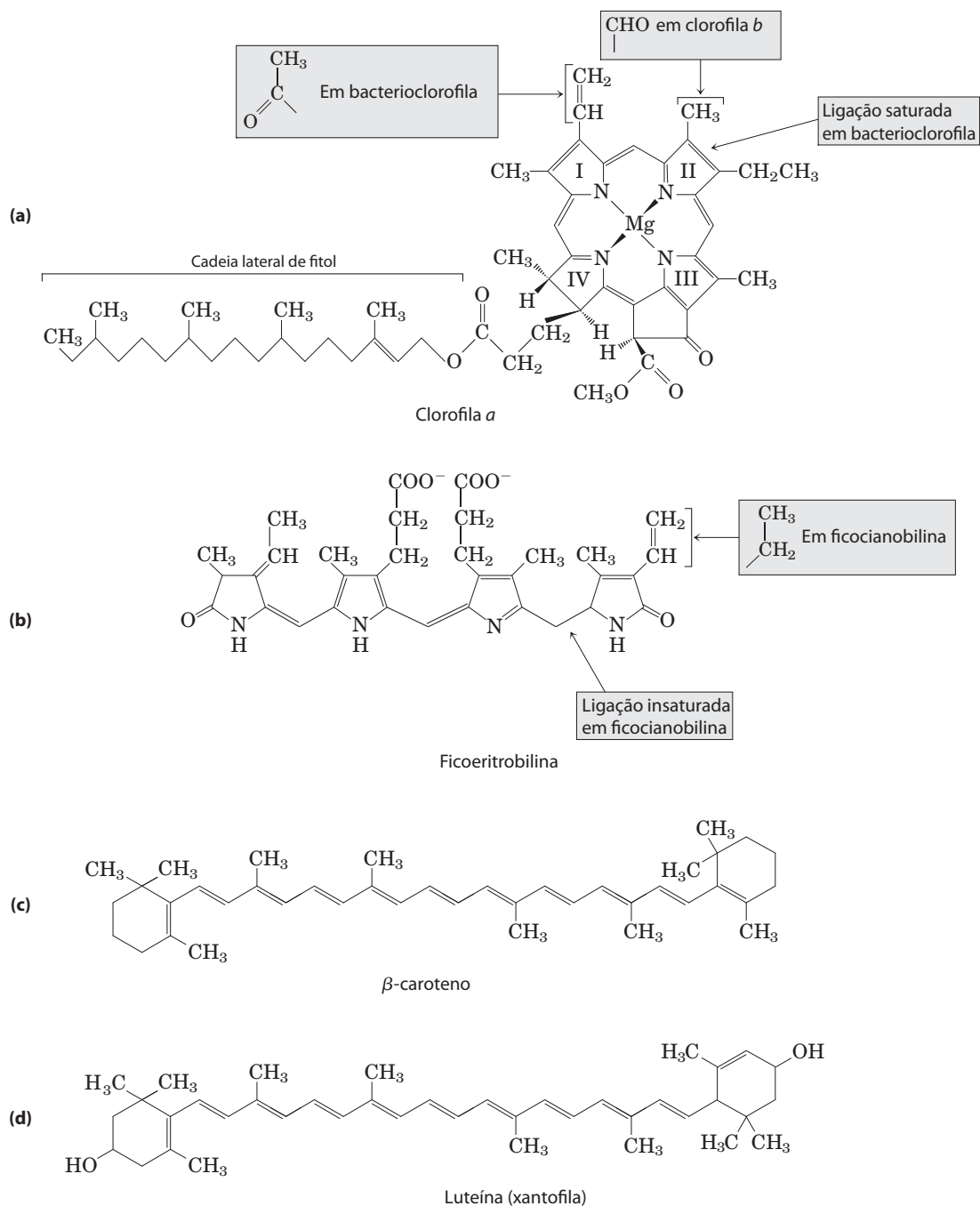



**FIGURA 19-49 Fotopigmentos primários e secundários. (a)** Clorofilas *a* e *b* e bacterioclorofila são os coletores primários de energia luminosa. **(b)** Ficoeritrobilina e ficocianobilina (ficobilinas) são os pigmentos antenas em cianobactérias e algas vermelhas. **(c)** *β*-Caroteno (carotenoide) e **(d)** luteína (uma xantofila) são pigmentos acessórios em plantas. Os sistemas conjugados (ligações simples e duplas alternadas) nestas moléculas são os grandes responsáveis pela absorção da luz visível.

rofila estão coordenados com o $Mg^{2+}$. Todas as clorofilas têm uma longa cadeia lateral de **fitol**, esterificada a um grupo carboxil substituinte no anel IV, e as clorofilas também têm um quinto anel de cinco membros ausente no heme.

O sistema heterocíclico de cinco anéis que circunda o $Mg^{2+}$ tem uma estrutura estendida de polieno, com ligações simples e duplas alternadas. Tais polienos mostram, caracteristicamente, forte absorção na região visível do espectro (**Figura 19-50**); as clorofilas têm coeficientes de extinção molar excepcionalmente altos (ver Quadro 3-1), sendo, portanto, particularmente bem aptas a absorver a luz visível durante a fotossíntese.

Os cloroplastos sempre contêm tanto clorofila *a* quanto clorofila *b* (Figura 19-49a). Embora ambas sejam verdes, os seus espectros de absorção são suficientemente diferentes (Figura 19-50), de modo a complementarem a faixa de ab-

**FIGURA 19-50 Absorção de luz visível por fotopigmentos.** As plantas são verdes porque seus pigmentos absorvem luz das regiões azul e vermelha do espectro, deixando principalmente a luz verde para ser refletida. Compare os espectros de absorção dos pigmentos com o espectro da luz solar que chega na superfície da terra; a combinação de clorofilas (*a* e *b*) e pigmentos acessórios possibilita às plantas coletar a maior parte da energia disponível na luz solar.

As quantidades relativas de clorofilas e pigmentos acessórios são características de uma espécie vegetal em particular. A variação na proporção desses pigmentos é responsável pela gama de cores dos organismos fotossintéticos, do profundo verde azulado das acículas de abeto, ao verde mais verde das folhas de plátano, à cor vermelha, marrom ou púrpura de algumas espécies multicelulares de algas e das folhas de algumas folhagens cultivadas por jardineiros.

sorção de luz uma da outra na região visível. A maioria das plantas contém duas vezes mais clorofila *a* do que clorofila *b*. Os pigmentos em algas e em bactérias fotossintéticas incluem clorofilas que diferem apenas levemente dos pigmentos das plantas.

A clorofila está sempre associada a proteínas específicas de ligação, formando **complexos coletores de luz** (**LHC**, de *light-harvesting complexes*), nos quais as moléculas de clorofila estão fixas em relação umas às outras, a outros complexos proteicos e à membrana. Um complexo coletor de luz (LHCII; **Figura 19-51**) contém sete moléculas de clorofila *a*, cinco de clorofila *b* e duas do pigmento acessório luteína (ver a seguir).

As cianobactérias e as algas vermelhas utilizam **ficobilinas** como ficoeritrobilina e ficocianobilina (Figura 19-49b) como seus pigmentos de captura de luz. Esses tetrapirróis de cadeia aberta têm o sistema de polieno estendido encontrado nas clorofilas, mas não sua estrutura cíclica e seu $Mg^{2+}$ central. As ficobilinas são covalentemente ligadas a proteínas específicas de ligação, formando **ficobiliproteínas**, que se associam em complexos altamente ordenados chamados de ficobilissomos (**Figura 19-52**), que constituem as estruturas primárias de coleta de luz nesses microrganismos.

## Os pigmentos acessórios estendem a faixa de absorção de luz

Além das clorofilas, as membranas tilacoides contêm pigmentos secundários de absorção de luz, ou **pigmentos acessórios**, chamados de carotenoides. Os **carotenoides** podem ser de cor amarela, vermelha ou púrpura. Os mais importantes são o **β-caroteno**, isoprenoide laranja-avermelhado, e o carotenoide amarelo **luteína** (Figura 19-49c, d). Os pigmentos carotenoides absorvem luz em comprimentos de onda não absorvidos pelas clorofilas (Figura 19-50), sendo assim receptores de luz suplementares.

**FIGURA 19-51 Um complexo coletor de luz, LHCII.** (PDB ID 2BHW) A unidade funcional é um trímero LHC, com 36 moléculas de clorofila e 6 de luteína. Ilustrado aqui está um monômero, visto no plano da membrana, com seus três segmentos α-helicoidais transmembrana, sete moléculas de clorofila *a* (em verde-claro), cinco moléculas de clorofila *b* (em verde-escuro) e duas moléculas do pigmento acessório luteína (em amarelo), que formam uma braçadeira interna em cruz.

**FIGURA 19-52 Um ficobilissomo.** Nestes conjuntos altamente estruturados, encontrados em cianobactérias e algas vermelhas, os pigmentos ficobilinas ligados a proteínas específicas formam complexos chamados de ficoeritrina (FE), ficocianina (FC) e aloficocianina (AF). A energia dos fótons absorvidos por FE ou FC é conduzida por meio de AF (proteína ligadora de ficocianobilina) para a clorofila *a* do centro de reação por transferência de éxcitons, processo discutido no texto.

A determinação experimental da efetividade da luz de diferentes cores em promover a fotossíntese gera um **espectro de ação** (**Figura 19-53**), normalmente útil na identificação do pigmento primariamente responsável por um efeito biológico da luz. Captando luz na região do espectro não utilizada por outros organismos, um organismo fotossintético pode ocupar um nicho ecológico singular. Por exemplo, as ficobilinas nas algas vermelhas e nas cianobactérias absorvem luz na faixa de 520 a 630 nm (Figura 19-50), o que permite que ocupem nichos nos quais a luz de comprimentos de onda mais baixos ou mais altos foi filtrada pelos pigmentos de outros organismos que vivem na água acima delas ou pela própria água.

**FIGURA 19-53 Duas formas de determinar o espectro de ação para a fotossíntese. (a)** Resultados de um experimento clássico realizado por T. W. Englemann em 1882 para determinar o comprimento de onda da luz mais efetivo em sustentar a fotossíntese. Englemann colocou células de uma alga fotossintética filamentosa em uma lâmina de microscópio e a iluminou com a luz de um prisma, de modo que parte do filamento recebia principalmente luz azul, outra parte amarela, outra vermelha. Para determinar quais as células da alga que realizavam fotossíntese mais ativamente, Englemann também colocou sobre a lâmina de microscópio bactérias conhecidas por migrar em direção a regiões de alta concentração de $O_2$. Depois de um período de iluminação, a distribuição das bactérias mostrou os maiores níveis de $O_2$ (produzido pela fotossíntese) nas regiões iluminadas com luz violeta e vermelha.

**(b)** Resultados de um experimento similar que usa técnicas modernas (eletrodo de oxigênio) para medir a produção de $O_2$. Um espectro de ação (como mostrado aqui) descreve a taxa relativa de fotossíntese para a iluminação com um número constante de fótons de diferentes comprimentos de onda. Um espectro de ação é útil porque, em comparação com espectros de absorção (como aqueles na Figura 19-50), ele sugere quais pigmentos podem canalizar energia para a fotossíntese.

## A clorofila canaliza a energia absorvida para os centros de reação pela transferência de éxcitons

Os pigmentos absorvedores de luz das membranas tilacoides ou bacterianas estão arranjados em estruturas funcionais denominadas **fotossistemas**. Em cloroplastos de espinafre, por exemplo, cada fotossistema contém cerca de 200 moléculas de clorofila e 50 de carotenoides. Todas as moléculas de pigmentos em um fotossistema podem absorver fótons, mas apenas poucas moléculas de clorofila, associadas ao **centro de reação fotoquímica**, são especializadas na transdução de luz em energia química. As outras moléculas de pigmento em um fotossistema são chamadas de **moléculas coletoras de luz** ou **antenas moleculares**. Elas absorvem a energia luminosa e a transmitem de modo rápido e eficiente ao centro de reação (**Figura 19-54**).

As moléculas de clorofila nos complexos coletores de luz têm propriedades de absorção de luz que são sutilmente diferentes daquelas da clorofila livre. Quando moléculas de clorofila isoladas *in vitro* são excitadas pela luz, a energia absorvida é rapidamente liberada como fluorescência e calor, mas quando a clorofila em folhas intactas é excitada pela luz visível (**Figura 19-55**, etapa ❶), muito pouca fluorescência é observada. Em vez disso, a clorofila excitada que funciona como antena molecular transfere energia diretamente a uma molécula de clorofila vizinha, a qual se torna excitada à medida que a primeira molécula retorna ao seu estado basal (etapa ❷). Essa transferência de energia, a transferência de éxciton, se estende a uma terceira, quarta ou subsequente vizinha, até que uma de um par especial de

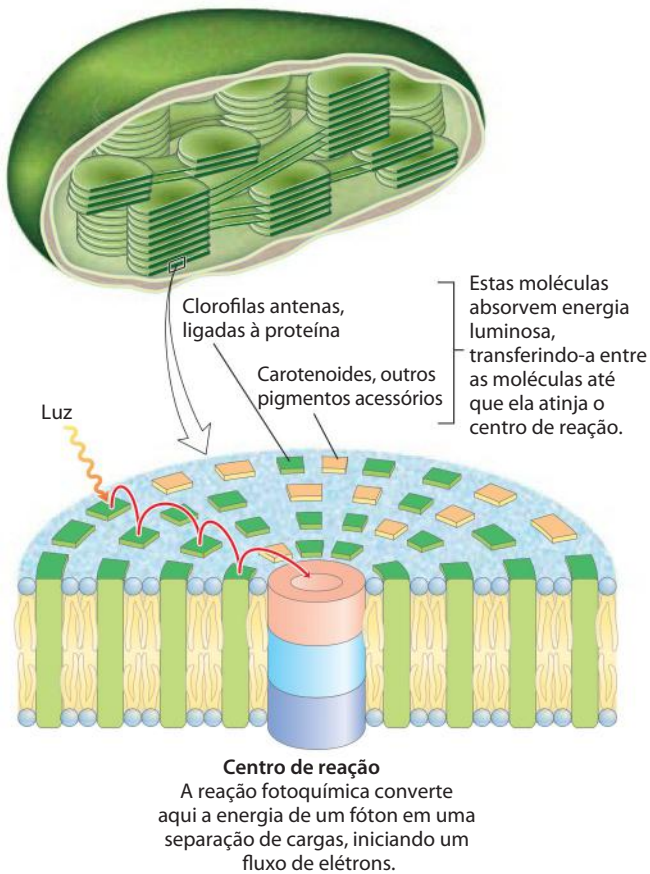



**FIGURA 19-54 Organização dos fotossistemas nas membranas tilacoides.** Os fotossistemas são firmemente empacotados na membrana tilacoide, com várias centenas de clorofilas e pigmentos acessórios do tipo antena circundando um centro de fotorreação. A absorção de um fóton por qualquer uma das clorofilas antenas leva à excitação do centro de reação por transferência de éxcitons (seta vermelha). Também embebidos na membrana tilacoide estão o complexo de citocromos $b_6f$ e a ATP-sintase (ver Figura 19-61).

moléculas de clorofila *a* no centro de reação fotoquímica seja excitada (etapa ❸). Nessa molécula excitada de clorofila, um elétron é promovido a um orbital de maior energia. Esse elétron passa então a um aceptor de elétrons próximo, que é parte da cadeia de transferência de elétrons, deixando a clorofila do centro de reação com um elétron a menos (um "buraco eletrônico", indicado por + na Figura 19-55) (etapa ❹). O aceptor de elétrons adquire uma carga negativa nessa transação. O elétron perdido pela clorofila do centro de reação é reposto por um elétron de uma molécula doadora de elétrons vizinha (etapa ❺), a qual, então, se tor-

Moléculas da antena

Clorofila do centro de reação

Luz

❶ A luz excita uma molécula de antena (clorofila ou pigmento acessório), elevando o elétron a um nível maior de energia.

❷ A molécula excitada da antena passa energia para uma molécula vizinha de clorofila (transferência de éxciton), excitando-a.

❸ Esta energia é transferida para uma clorofila do centro de reação, excitando-a.

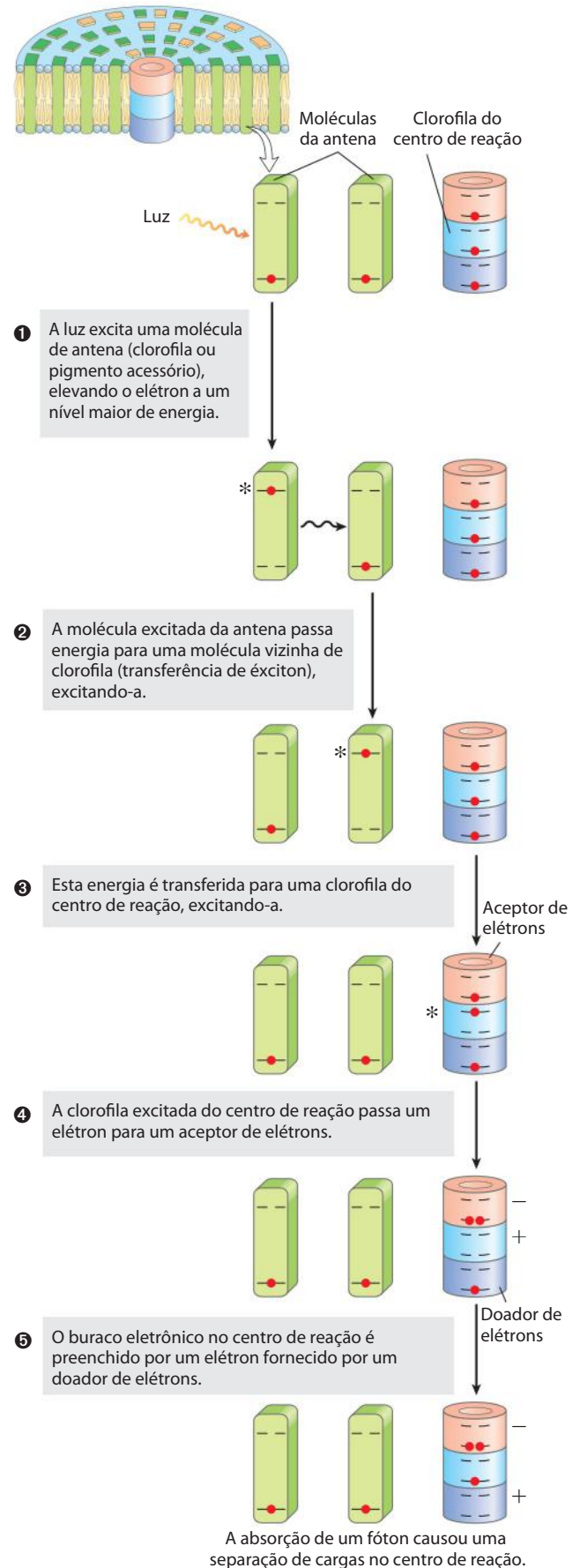
Aceptor de elétrons

❹ A clorofila excitada do centro de reação passa um elétron para um aceptor de elétrons.

Doador de elétrons

❺ O buraco eletrônico no centro de reação é preenchido por um elétron fornecido por um doador de elétrons.

A absorção de um fóton causou uma separação de cargas no centro de reação.

**FIGURA 19-55 Éxciton e transferência de elétrons.** Este esquema geral mostra a conversão da energia de um fóton absorvido na separação de cargas no centro de reação. As etapas são adicionalmente descritas no texto. Observe que a etapa ❶ pode se repetir entre moléculas sucessivas da antena até que o éxciton atinja uma clorofila do centro de reação. O asterisco (*) representa o estado excitado de uma molécula.

na positivamente carregada. Dessa forma, *a excitação pela luz causa separação de cargas elétricas e inicia uma cadeia de oxidação-redução.*

### RESUMO 19.7 Absorção de luz

- Um fóton de luz visível tem energia suficiente para desencadear reações fotoquímicas que, em organismos fotossintéticos, acabam levando à síntese de ATP.
- Nas reações de luz das plantas, a absorção de um fóton excita as moléculas de clorofila e outros pigmentos (acessórios), os quais canalizam a energia para os centros de reação nas membranas tilacoides. Nos centros de reação, a fotoexcitação resulta em uma separação de cargas que produz um forte doador de elétrons (agente redutor) e um forte aceptor de elétrons.

## 19.8 Evento fotoquímico central: fluxo de elétrons promovido pela luz

A transferência de elétrons promovida pela luz em cloroplastos vegetais durante a fotossíntese é realizada por sistemas multienzimas na membrana tilacoide. A visão atual dos mecanismos fotossintéticos é uma composição elaborada a partir de estudos de cloroplastos de plantas e de uma variedade de algas e bactérias. A determinação das estruturas moleculares dos complexos fotossintéticos bacterianos (por cristalografia por raios X) forneceu uma compreensão muito mais aprimorada dos eventos moleculares na fotossíntese em geral.

### As bactérias têm apenas um de dois tipos de centros de reação fotoquímicos

Uma importante contribuição dos estudos de bactérias fotossintéticas surgiu em 1952, quando Louis Duysens verificou que a iluminação de membranas fotossintéticas da bactéria púrpura *Rhodospirillum rubrum* com um pulso de luz de um comprimento de onda específico (870 nm) causava um decréscimo temporário na absorção de luz naquele comprimento de onda; um pigmento era "descorado" por luz de 870 nm. Estudos posteriores de Bessel Kok e Horst Witt mostraram descoloração similar de pigmentos de cloroplastos vegetais por luz de 680 e 700 nm. Além disso, a adição do aceptor de elétrons (não biológico) $[Fe(CN)_6]^{3-}$ (ferricianeto) causou a descoloração nestes comprimentos de onda *sem iluminação*. Esses achados indicaram que a descoloração de pigmentos se devia à perda de um elétron de um centro de reação fotoquímico. Os pigmentos foram denominados de acordo com o comprimento de onda de maior descoloração: P870, P680 e P700.

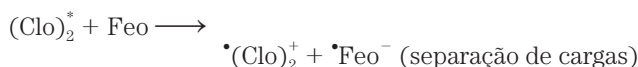
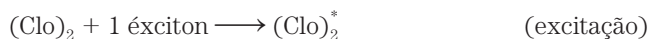
As bactérias fotossintéticas têm uma maquinaria de fototransdução relativamente simples, com um de dois tipos gerais de centros de reação. Um tipo (encontrado em bactérias púrpuras) passa elétrons por meio da **feofitina** (clorofila sem o íon central de $Mg^{2+}$) para uma quinona. O outro tipo (em bactérias verdes sulfurosas) passa elétrons por meio de uma quinona para um centro de ferro-enxofre. As cianobactérias e as plantas têm dois fotossistemas (PSI e PSII), um de cada tipo, atuando em sequência. Estudos bioquímicos e biofísicos revelaram muitos dos detalhes moleculares dos centros de reação das bactérias, servindo assim como protótipos para o sistema mais complexo de fototransdução das plantas.

**O centro de reação feofitina-quinona (centro de reação tipo II)** A maquinaria fotossintética em bactérias púrpuras consiste em três módulos básicos (**Figura 19-56a**): um único centro de reação (P870), um complexo de transferência de elétrons, o citocromo $bc_1$, similar ao complexo III da cadeia mitocondrial de transferência de elétrons, e uma ATP-sintase, também similar àquela das mitocôndrias. A iluminação impulsiona os elétrons pela feofitina e de uma quinona para o complexo de citocromos $bc_1$. Depois de passarem pelo complexo, os elétrons fluem pelo citocromo $c_2$ de volta ao centro de reação, restabelecendo o seu estado pré-iluminação. Esse fluxo cíclico de elétrons promovido pela luz fornece a energia para o bombeamento de prótons pelo complexo de citocromos $bc_1$. Energizada pelo gradiente de prótons resultante, a ATP-sintase produz ATP, exatamente como nas mitocôndrias.

As estruturas tridimensionais dos centros de reação das bactérias púrpuras (*Rhodopseudomonas viridis* e *Rhodobacter sphaeroides*), deduzidas a partir da cristalografia de raios X, esclareceu como ocorre a fototransdução em um centro de reação feofitina-quinona. O centro de reação de *R. viridis* (**Figura 19-57a**) é um grande complexo proteico que contém quatro subunidades de polipeptídeos e 13 cofatores: dois pares de clorofilas bacterianas, um par de feofitinas, duas quinonas, um ferro não heme e quatro hemes no citocromo tipo *c* associado.

A sequência extremamente rápida de transferências de elétrons mostrada na Figura 19-57b foi deduzida a partir de estudos físicos dos centros feofitina-quinona bacterianos, usando breves *flashes* de luz para desencadear a fototransdução e uma variedade de técnicas espectroscópicas para acompanhar o fluxo de elétrons por meio de vários carregadores. Um par de bacterioclorofilas – o "par especial", chamado de $(Clo)_2$ – é o sítio da fotoquímica inicial no centro de reação bacteriano. A energia de um fóton absorvido por uma das muitas moléculas de clorofila antena que circundam o centro de reação atinge $(Clo)_2$ por transferência de éxcitons. Quando essas duas moléculas de clorofila – tão próximas que seus orbitais de ligação se sobrepõem – absorvem um éxciton, o potencial redox de $(Clo)_2$ é deslocado em uma quantidade equivalente à energia do fóton, convertendo o par especial em um doador de elétrons muito forte. O $(Clo)_2$ doa um elétron que passa por meio de um monômero vizinho de clorofila para a feofitina (Feo). Isso produz dois radicais, um positivamente carregado (o par especial de clorofilas) e um negativamente carregado (a feofitina):

$$(Clo)_2 + 1 \text{ éxciton} \longrightarrow (Clo)_2^* \qquad \text{(excitação)}$$

$$(Clo)_2^* + Feo \longrightarrow {}^{\bullet}(Clo)_2^+ + {}^{\bullet}Feo^- \qquad \text{(separação de cargas)}$$

O radical feofitina passa agora o seu elétron para uma molécula de quinona firmemente ligada ($Q_A$), convertendo-a em

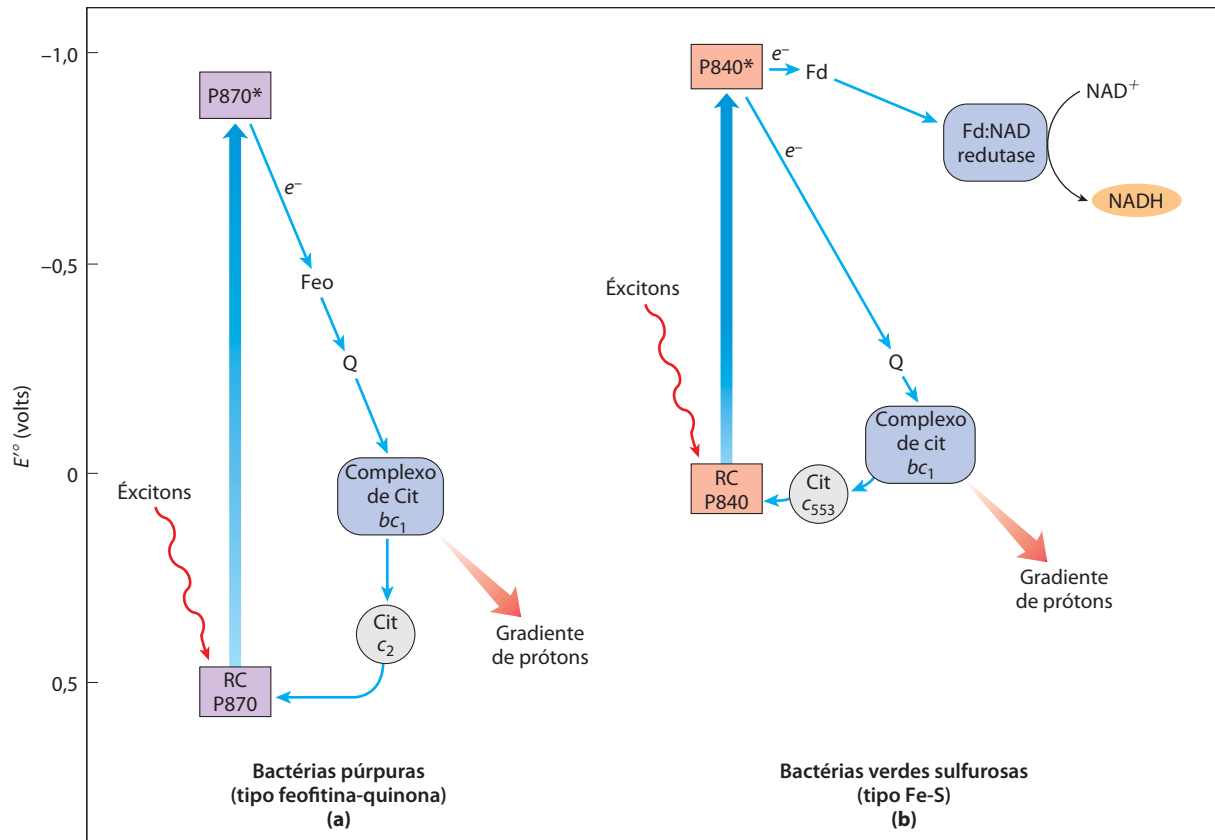
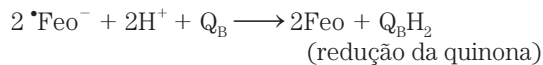



**FIGURA 19-56** **Módulos funcionais da maquinaria fotossintética em bactérias púrpuras e bactérias verdes sulfurosas.** **(a)** Em bactérias púrpuras, a energia da luz impulsiona os elétrons do centro de reação P870 por meio da feofitina (Feo), de uma quinona (Q) e do complexo de citocromos $bc_1$, seguindo pelo citocromo $c_2$ e então de volta ao centro de reação. O fluxo de elétrons pelo complexo de citocromos $bc_1$ causa o bombeamento de prótons, criando um potencial eletroquímico que permite a síntese de ATP. **(b)** As bactérias verdes sulfurosas têm duas vias para os elétrons impulsionadas pela excitação do P840: uma via cíclica, por meio de uma quinona para o complexo de citocromos $bc_1$ e de volta ao centro de reação via citocromo *c*, e uma via acíclica, partindo do centro de reação, por meio da proteína ferro-enxofre ferredoxina (Fd) e, então, para o $NAD^+$, em uma reação catalisada pela ferredoxina:NAD-redutase.

um radical semiquinona, que imediatamente doa o seu elétron extra para uma segunda quinona, frouxamente ligada ($Q_B$). Duas transferências de elétrons desse tipo convertem $Q_B$ em sua forma totalmente reduzida, $Q_BH_2$, que está livre para se difundir na bicamada da membrana, afastando-se do centro de reação:

$$2\,^{\bullet}\text{Feo}^{-} + 2\text{H}^{+} + \text{Q}_B \longrightarrow 2\text{Feo} + \text{Q}_B\text{H}_2$$
(redução da quinona)

A hidroquinona ($Q_BH_2$), carregando em suas ligações químicas parte da energia dos fótons que originalmente excitaram P870, ingressa no conjunto (*pool*) de quinonas reduzidas ($QH_2$) dissolvido na membrana e move-se pela fase lipídica da bicamada para o complexo de citocromos $bc_1$.

Da mesma forma que o homólogo complexo III nas mitocôndrias, o complexo de citocromos $bc_1$ das bactérias púrpuras carrega elétrons de um doador quinol ($QH_2$) para um aceptor de elétrons, usando a energia da transferência de elétrons para bombear prótons através da membrana, produzindo uma força próton-motriz. Acredita-se que a via do fluxo de elétrons por este complexo seja muito similar àquela pelo complexo III mitocondrial, envolvendo um ciclo Q (Figura 19-12) no qual prótons são consumidos em um lado da membrana e liberados no outro. O aceptor final de elétrons em bactérias púrpuras é a forma deficitária de elétrons de P870, $^{\bullet}(\text{Clo})_2^{+}$ (Figura 19-56a). Os elétrons movem-se do complexo de citocromos $bc_1$ para o P870 por meio de um citocromo tipo *c* solúvel, citocromo $c_2$. O processo de transferência de elétrons completa o ciclo, devolvendo o centro de reação ao seu estado não descorado, pronto para absorver outro éxciton das clorofilas antenas.

Uma característica notável desse sistema é que toda a química ocorre no *estado sólido*, com espécies reativas mantidas próximas umas das outras na orientação correta para a reação. O resultado é uma série de reações muito rápidas e eficientes.

**O centro de reação Fe-S (centro de reação tipo I).** A fotossíntese em bactérias verdes sulfurosas envolve os mesmos três módulos das bactérias púrpuras, mas o processo difere em vários aspectos e envolve reações enzimáticas adicionais (Figura 19-56b). A excitação faz um elétron se mover do centro de reação ao complexo de citocromos $bc_1$ por meio de uma quinona carregadora. A transferência de elétrons

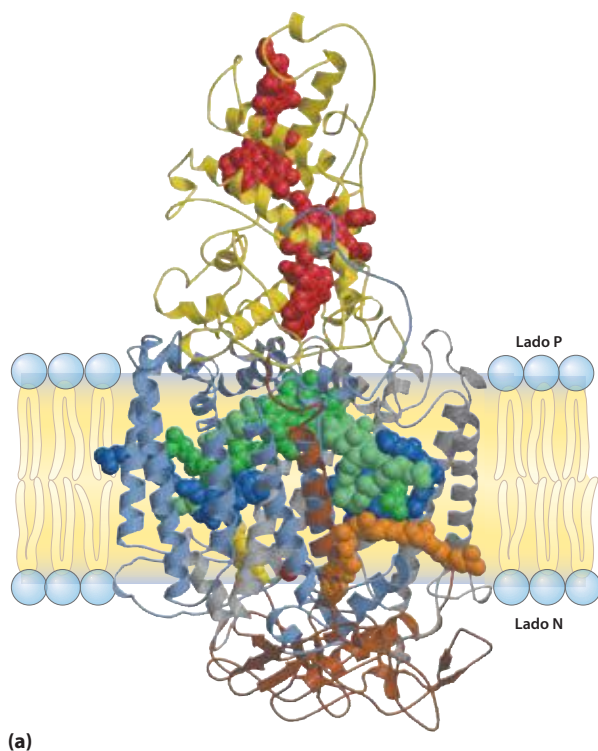
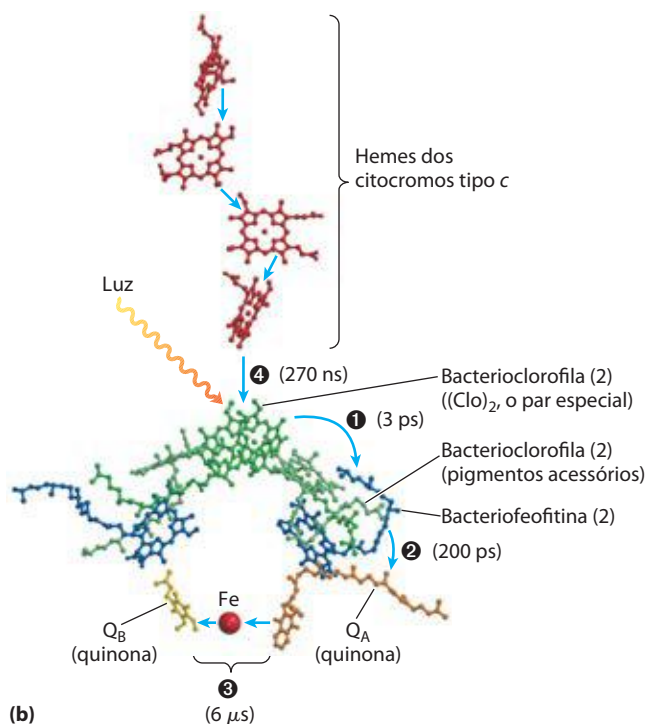



**FIGURA 19-57** **Centro de fotorreação da bactéria púrpura *Rhodopseudomonas viridis*.** (PDB ID 1PRC) **(a)** O sistema tem quatro componentes: três subunidades, H, M e L (em marrom, azul e cinza, respectivamente), com um total de 11 segmentos de hélices transmembrana, e uma quarta proteína, citocromo *c* (em amarelo), associada com o complexo na superfície da membrana. As subunidades L e M são proteínas transmembrana pareadas, que juntas formam uma estrutura cilíndrica com simetria grosseiramente bilateral ao longo de seu eixo longo. Ilustrados como modelos de volume atômico [e em (b) como modelos de esferas e bastões] estão os grupos prostéticos que participam dos eventos fotoquímicos. Ligados às cadeias L e M estão os dois pares de moléculas de bacterioclorofilas (em verde); um dos pares – o "par especial" $(Clo)_2$ – é o sítio das primeiras mudanças fotoquímicas após a absorção da luz. Também incorporados no sistema estão um par de moléculas de feofitina *a* (Feo *a*) (em azul); duas quinonas, menaquinona ($Q_A$) e ubiquinona ($Q_B$) (em cor de laranja e amarelo), também arranjadas com simetria bilateral; e um único Fe não heme (em vermelho), localizado aproximadamente no eixo de simetria entre as quinonas. Mostrados na parte superior da figura, estão quatro grupos heme (em vermelho), associados com o citocromo tipo *c* do centro de reação.

**(b)** Sequência de eventos que seguem a excitação do par especial de bacterioclorofilas [todos os componentes coloridos como em (a)], com a escala de tempo das transferências de elétrons entre parênteses. ❶ O par especial excitado passa um elétron para a feofitina, ❷ de onde o elétron rapidamente se move até a menaquinona ($Q_A$) fortemente ligada. ❸ Esta quinona passa elétrons muito mais lentamente à ubiquinona difusível, $Q_B$, por meio do Fe não heme. Enquanto isto, ❹ o "buraco eletrônico" no par especial é preenchido por um elétron do heme do citocromo *c*.

por esse complexo fornece energia para o transporte de prótons e cria a força próton-motriz usada para a síntese de ATP, da mesma forma que em bactérias púrpuras e mitocôndrias. No entanto, ao contrário do fluxo cíclico de elétrons nas bactérias púrpuras, alguns elétrons fluem do centro de reação para uma proteína ferro-enxofre, **ferredoxina**, que então passa elétrons, via ferredoxina: NAD-redutase, para o $NAD^+$, produzindo NADH. Os elétrons retirados do centro de reação para reduzir o $NAD^+$ são repostos pela oxidação de $H_2S$ a S elementar e, então, a $SO_4^{2-}$, em uma reação que define as bactérias verdes sulfurosas. A oxidação de $H_2S$ por bactérias é quimicamente análoga à oxidação da água em plantas oxigênicas.

## Fatores cinéticos e termodinâmicos impedem a dissipação da energia por conversão interna

A construção complexa dos centros de reação é o produto da seleção evolutiva visando à eficiência do processo fotossintético. O estado excitado $(Clo)_2$* poderia, a princípio, decair para seu estado basal por conversão interna, um processo muito rápido (10 picossegundos; 1 ps $= 10^{-12}$ s), no qual a energia do fóton absorvido é convertida em calor (movimento molecular). Os centros de reação são construídos para impedir a ineficiência que resultaria da conversão interna. As proteínas dos centros de reação mantêm as bacterioclorofilas, bacteriofeofitinas e quinonas em uma orientação fixa em relação umas às outras, permitindo que as reações fotoquímicas ocorram em um estado quase sólido. Isso explica a alta eficiência e rapidez das reações; não há margem para colisão ocasional e difusão aleatória. A transferência de éxcitons da clorofila antena para o par especial do centro de reação é realizada em menos de 100 ps, com eficiência $> 90\%$. Dentro de 3 ps após a excitação de P870, a feofitina recebeu um elétron e tornou-se um radical negativamente carregado; menos de 200 ps mais tarde, o elétron atingiu a quinona $Q_B$ (Figura 19-57b). As reações de transferência de elétrons não são apenas rápidas, mas, termodinamicamente, são "montanha abaixo"; o par especial excitado $(Clo)_2^*$ é um doador de elétrons muito bom ($E'^{\circ} =$

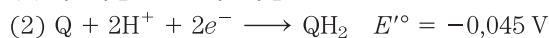
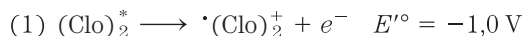
$-1$ V) e cada transferência sucessiva de elétrons é para um aceptor com $E'^{\circ}$ substancialmente menos negativo. A variação na energia livre padrão para o processo é, portanto, negativa e grande; lembre do Capítulo 13 que $\Delta G'^{\circ} = -n \Delta E'^{\circ}$; aqui, $\Delta E'^{\circ}$ é a diferença entre os potenciais de redução padrão das duas hemirreações

$$(1)\ (\text{Clo})_2^* \longrightarrow {}^{\bullet}(\text{Clo})_2^+ + e^- \quad E'^{\circ} = -1{,}0\ \text{V}$$

$$(2)\ \text{Q} + 2\text{H}^+ + 2e^- \longrightarrow \text{QH}_2 \quad E'^{\circ} = -0{,}045\ \text{V}$$

Assim

$$\Delta E'^{o} = -0{,}045\ \text{V} - (-1{,}0\ \text{V}) \approx 0{,}95\ \text{V}$$

e

$$\Delta G'^{o} = -2\ (96{,}5\ \text{kJ/V} \cdot \text{mol})\ (0{,}95\text{V}) = -180\ \text{kJ/mol}$$

A combinação da cinética rápida e da termodinâmica favorável torna o processo praticamente irreversível e altamente eficiente. A produtividade global de energia (o percentual da energia do fóton conservada em $QH_2$) é > 30%, com o restante da energia dissipado como calor e entropia.

## Nas plantas, dois centros de reação agem em sequência

O aparato fotossintético de cianobactérias modernas, algas e plantas vasculares é mais complexo do que os sistemas bacterianos com apenas um centro e parece ter evoluído pela combinação de dois fotocentros bacterianos mais simples. As membranas tilacoides dos cloroplastos têm dois tipos diferentes de fotossistemas, cada um com seu próprio tipo de centro de reação fotoquímico e de conjunto de moléculas antenas. Os dois sistemas têm funções distintas e complementares (**Figura 19-58**). O **fotossistema II** (**PSII**) é um sistema do tipo feofitina-quinona (como o fotossistema único das bactérias púrpuras), contendo quantidades aproximadamente iguais de clorofilas *a* e *b*. A excitação de seu centro de reação P680 impulsiona os elétrons pelo complexo de citocromos $b_6f$, com movimento concomitante de prótons através da

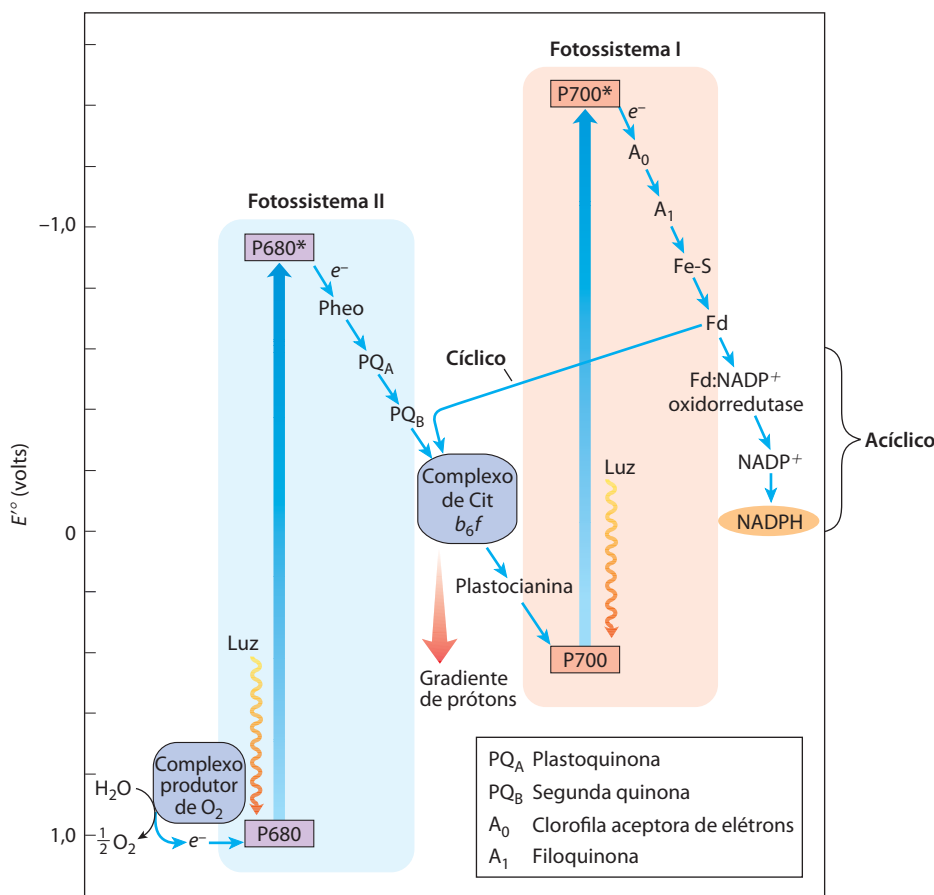



**FIGURA 19-58 Integração dos fotossistemas I e II nos cloroplastos.** Este "esquema Z" mostra a via da transferência de elétrons da água (parte inferior, à esquerda) para o $NADP^+$ (bem à direita) na fotossíntese acíclica. A posição na escala vertical de cada carregador de elétrons reflete seu potencial de redução padrão. Para aumentar a energia dos elétrons derivados de $H_2O$ para o nível de energia requerido para reduzir o $NADP^+$ a NADPH, cada elétron precisa ter sua energia "elevada" duas vezes (setas largas) por fótons absorvidos em PSII e PSI. É necessário um fóton por elétron em cada fotossistema. Depois da excitação, os elétrons de alta energia fluem "montanha abaixo" pelas cadeias carregadoras ilustradas. Os prótons se movem pela membrana tilacoide durante a reação de quebra da água e durante a transferência de elétrons pelo complexo de citocromos $b_6f$, produzindo o gradiente de prótons que é essencial para a formação de ATP. Uma via alternativa é a transferência cíclica de elétrons, na qual os elétrons se deslocam da ferredoxina de volta ao complexo de citocromos $b_6f$, em vez de reduzirem $NADP^+$ a NADPH. A via cíclica produz mais ATP e menos NADPH do que a acíclica.

membrana tilacoide. O **fotossistema I (PSI**) está estrutural e funcionalmente relacionado ao centro de reação tipo I das bactérias verdes sulfurosas. Ele tem um centro de reação denominado P700 e uma alta razão entre clorofila *a* e clorofila *b*. O P700 excitado passa elétrons à proteína Fe-S ferredoxina e então para o $NADP^+$, produzindo NADPH. As membranas tilacoides de um único cloroplasto de espinafre têm muitas centenas de cada tipo de fotossistema.

Esses dois centros de reação em plantas agem em sequência para catalisar o movimento de elétrons promovido pela luz, de $H_2O$ para $NADP^+$ (Figura 19-58). Os elétrons são carregados entre os dois fotossistemas pela proteína solúvel **plastocianina**, carregador de um elétron funcionalmente similar ao citocromo *c* das mitocôndrias. Para repor os elétrons que se movem do PSII ao $NADP^+$ por meio do PSI, as cianobactérias e as plantas oxidam $H_2O$ (da mesma forma que as bactérias verdes sulfurosas oxidam $H_2S$), produzindo $O_2$ (Figura 19-58, parte inferior à esquerda). Esse processo é chamado de **fotossíntese oxigênica**, para distingui-lo da fotossíntese anoxigênica das bactérias púrpuras e verdes sulfurosas. Todas as células fotossintéticas que produzem $O_2$ – as das plantas, algas e cianobactérias – contêm tanto PSI quanto PSII; organismos com apenas um fotossistema não produzem $O_2$. O diagrama na Figura 19-58, comumente chamado de **esquema Z** devido à sua forma geral, esboça a via de fluxo de elétrons entre os dois fotossistemas e as relações de energia nas reações luminosas. Assim, o esquema Z descreve a via completa pela qual os elétrons fluem de $H_2O$ a $NADP^+$, de acordo com a equação

$$2H_2O + 2NADP^+ + 8 \text{ fótons} \longrightarrow O_2 + 2NADPH + 2H^+$$

Para cada dois fótons absorvidos (um em cada fotossistema), um elétron é transferido da água ao $NADP^+$. Para formar uma molécula de $O_2$, que exige a transferência de quatro elétrons de $H_2O$ a $NADP^+$, oito fótons precisam ser absorvidos no total, quatro por cada fotossistema.

Os detalhes mecanísticos das reações fotoquímicas em PSII e PSI são essencialmente semelhantes àqueles dos dois fotossistemas bacterianos, com várias adições importantes. No PSII, duas proteínas muito semelhantes, D1 e D2, formam um dímero quase simétrico, ao qual todos os cofatores carregadores de elétrons estão ligados (**Figura 19-59**). A excitação do P680 no PSII produz P680*, excelente doador de elétrons que, em picossegundos, transfere um elétron para feofitina, fornecendo a ela uma carga negativa ($^\bullet Feo^-$). Com a perda de seu elétron, P680* é transformado em um cátion radical, $P680^+$. $^\bullet Feo^-$ passa seu elétron extra muito rapidamente a uma **plastoquinona** ligada à proteína, $\mathbf{PQ_A}$ (ou $Q_A$), que, por sua vez, passa seu elétron a outra plastoquinona mais frouxamente ligada, $PQ_B$ (ou $Q_B$). Quando $PQ_B$ adquire dois elétrons de $PQ_A$ em duas dessas transferências e dois prótons do solvente água, ele está em sua forma totalmente reduzida de quinol, $PQ_BH_2$. A reação global iniciada pela luz no PSII é

$$4\ P680 + 4H^+ + 2\ PQ_B + 4 \text{ fótons} \longrightarrow 4\ P680^+ + 2\ PQ_BH_2 \qquad (19\text{-}12)$$

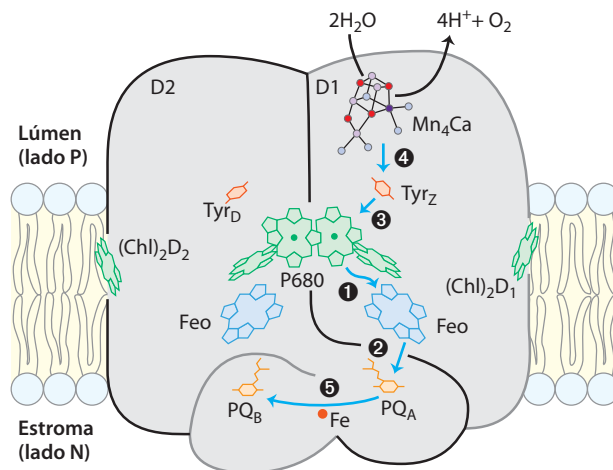
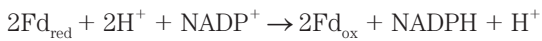



**FIGURA 19-59 Fotossistema II da cianobactéria *Synechococcus elongates*.** A forma monomérica do complexo mostrada aqui tem duas proteínas transmembrana principais, D1 e D2, cada uma com seu conjunto de cofatores. Embora as duas subunidades sejam aproximadamente simétricas, o fluxo de elétrons ocorre apenas por meio de um dos ramos de cofatores, aquele à direita (em D1). As setas mostram a via do fluxo de elétrons do aglomerado de íons $Mn_4Ca$ da enzima de quebra da água para a quinona $PQ_B$. Os eventos fotoquímicos ocorrem na sequência indicada pelos números das etapas. Observe a forte semelhança entre as posições dos cofatores neste fotossistema e as posições no centro de fotorreação bacteriano mostrado na Figura 19-57. O papel dos resíduos de Tyr e a estrutura detalhada do aglomerado de íons $Mn_4Ca$ são discutidos mais adiante (ver Figura 19-64b).

Por fim, os elétrons em $PQ_BH_2$ passam pelo complexo de citocromos $b_6f$ (Figura 19-58). O elétron inicialmente removido de P680 é reposto com um elétron obtido da oxidação da água, conforme descrito a seguir. O sítio de ligação para a plastoquinona é o ponto de ação de muitos herbicidas comerciais, que matam as plantas bloqueando a transferência de elétrons pelo complexo de citocromos $b_6f$ e impedindo a produção fotossintética de ATP.

Os eventos fotoquímicos que seguem a excitação do PSI no centro de reação P700 são formalmente semelhantes àqueles no PSII. O centro de reação excitado P700* perde um elétron para um aceptor $A_0$ (que se acredita ser uma forma especial de clorofila, funcionalmente homóloga à feofitina do PSII), criando $A_0^-$ e $P700^+$ (Figura 19-58, lado direito); novamente, a excitação resulta em separação de cargas no centro de reação fotoquímico. $P700^+$ é um agente oxidante forte, que rapidamente adquire um elétron da plastocianina, proteína solúvel transferidora de elétrons que contém Cu. $A_0^-$ é um agente redutor excepcionalmente forte, que passa seu elétron por meio de uma cadeia de carregadores que leva ao $NADP^+$. Primeiro, a **filoquinona** ($A_1$) aceita um elétron e o passa a uma proteína ferro-enxofre (por meio de três centros de Fe-S no PSI). Então, o elétron se move até a **ferredoxina** (Fd), outra proteína ferro-enxofre frouxamente associada à membrana tilacoide. A ferredoxina de espinafre ($M_r$ 10.700) contém um centro de 2Fe-2S (Figura 19-5) submetido à oxidação de um elétron e a reações de redução. O quarto carregador de elétrons na cadeia é a flavoproteína **ferredoxina:**$\mathbf{NADP^+}$-

**-oxidorredutase**, que transfere elétrons da ferredoxina reduzida ($Fd_{red}$) ao $NADP^+$:

$$2Fd_{red} + 2H^+ + NADP^+ \rightarrow 2Fd_{ox} + NADPH + H^+$$

Esta enzima é homóloga à ferredoxina:$NAD^+$-redutase das bactérias verdes sulfurosas (Figura 19-56b).

## As clorofilas antenas são fortemente integradas com os carregadores de elétrons

Os cofatores carregadores de elétrons do PSI e os complexos coletores de luz são parte de um complexo supramolecular (**Figura 19-60a**), cuja estrutura foi determinada

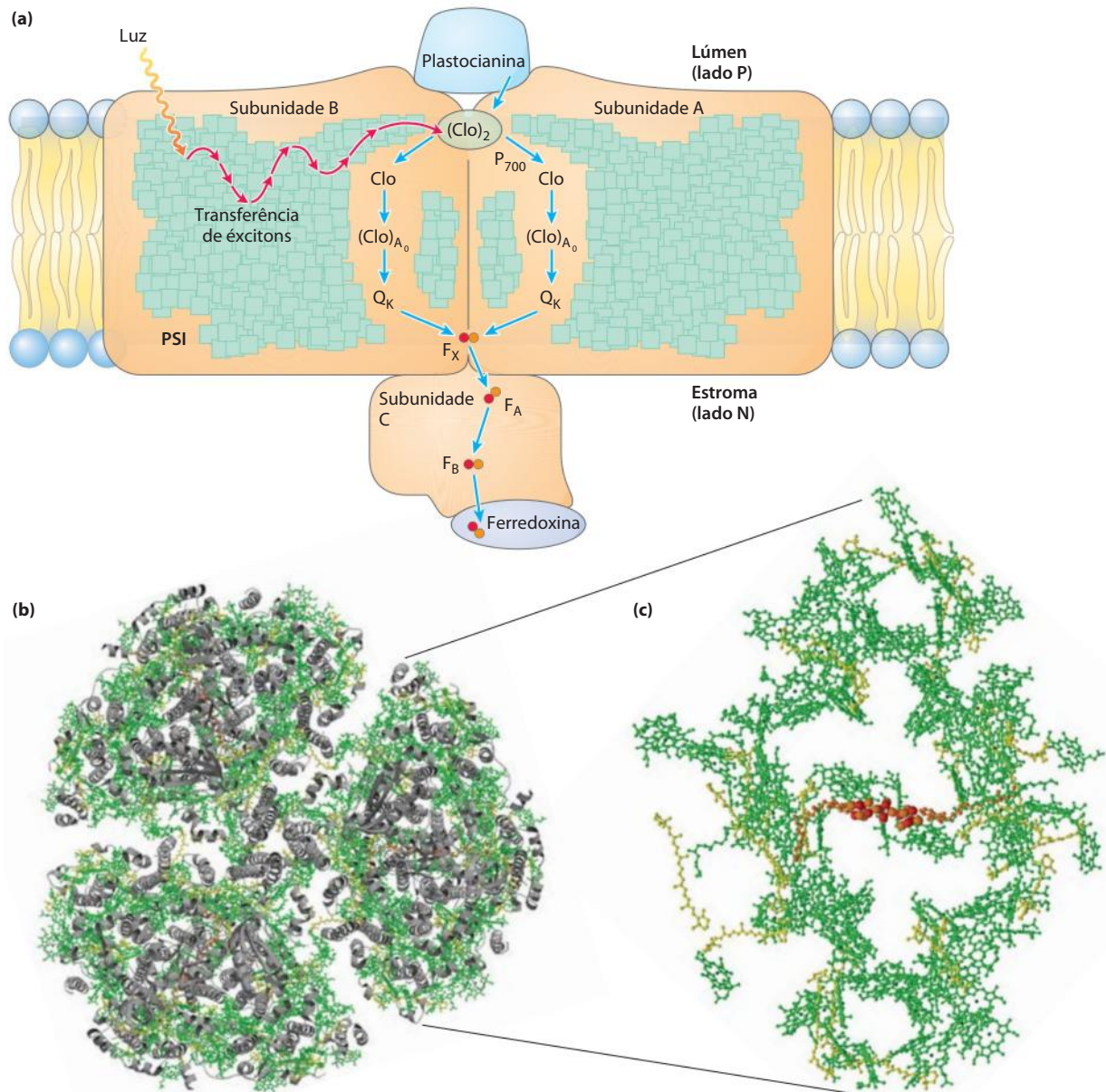



**FIGURA 19-60 O complexo supramolecular do PSI e suas clorofilas antenas associadas. (a)** Desenho esquemático das proteínas e dos cofatores essenciais em uma única unidade de PSI. Um grande número de clorofilas antenas circunda o centro de reação e conduz a ele (setas vermelhas) a energia absorvida dos fótons absorvidos. O resultado é a excitação do par de moléculas de clorofila que constitui o P700, reduzindo muito seu potencial de redução; o P700 então passa um elétron por meio de duas clorofilas próximas da filoquinona ($Q_K$; também chamada de $A_1$). A filoquinona reduzida é reoxidada quando passa dois elétrons, um de cada vez (setas azuis) para uma proteína Fe-S ($F_X$) perto do lado N da membrana. De $F_X$, os elétrons se movem por mais dois centros de Fe-S ($F_A$ e $F_B$) para a proteína Fe-S ferredoxina no estroma. A ferredoxina então doa elétrons para o $NADP^+$ (não mostrado), reduzindo-o a NADPH, uma das formas nas quais a energia dos fótons é aprisionada nos cloroplastos.

**(b)** Estrutura trimérica (derivada de PDB ID 1JBO), vista do lúmen do tilacoide perpendicular à membrana, mostrando todas as subunidades (em cinza) e cofatores da proteína. **(c)** Um monômero do PSI com todas as proteínas omitidas, revelando as clorofilas antenas e do centro de reação (em verde, com íons $Mg^{2+}$ verde-escuros no centro), os carotenoides (em amarelo) e os centros de Fe-S do centro de reação (estruturas de volume atômico em vermelho e cor de laranja). As proteínas no complexo mantêm os componentes rigidamente em orientações que maximizam as transferências eficientes de éxcitons entre as moléculas antenas excitadas e o centro de reação.

cristalograficamente. A proteína consiste em três complexos idênticos, cada um composto por 11 proteínas diferentes (Figura 19-60b). Nessa notável estrutura, as várias moléculas de clorofilas antenas e carotenoides estão precisamente arranjadas ao redor do centro de reação (Figura 19-60c). Os cofatores carregadores de elétrons do centro de reação estão, portanto, firmemente integrados com as clorofilas antenas. Esse arranjo permite a transferência muito rápida e eficiente de éxcitons das clorofilas antenas para o centro de reação. Ao contrário da via única de elétrons no PSII, acredita-se que o fluxo de elétrons iniciado pela absorção de um fóton ocorra pelos dois ramos de carregadores no PSI.

## O complexo de citocromos $b_6f$ liga os fotossistemas II e I

Os elétrons temporariamente estocados no plastoquinol como resultado da excitação do P680 no PSII são carregados para o P700 do PSI por meio do complexo de citocromos $b_6f$ e da proteína solúvel plastocianina (Figura 19-58, centro). Da mesma forma que o complexo III das mitocôndrias, o complexo de citocromos $b_6f$ (**Figura 19-61**) contém um

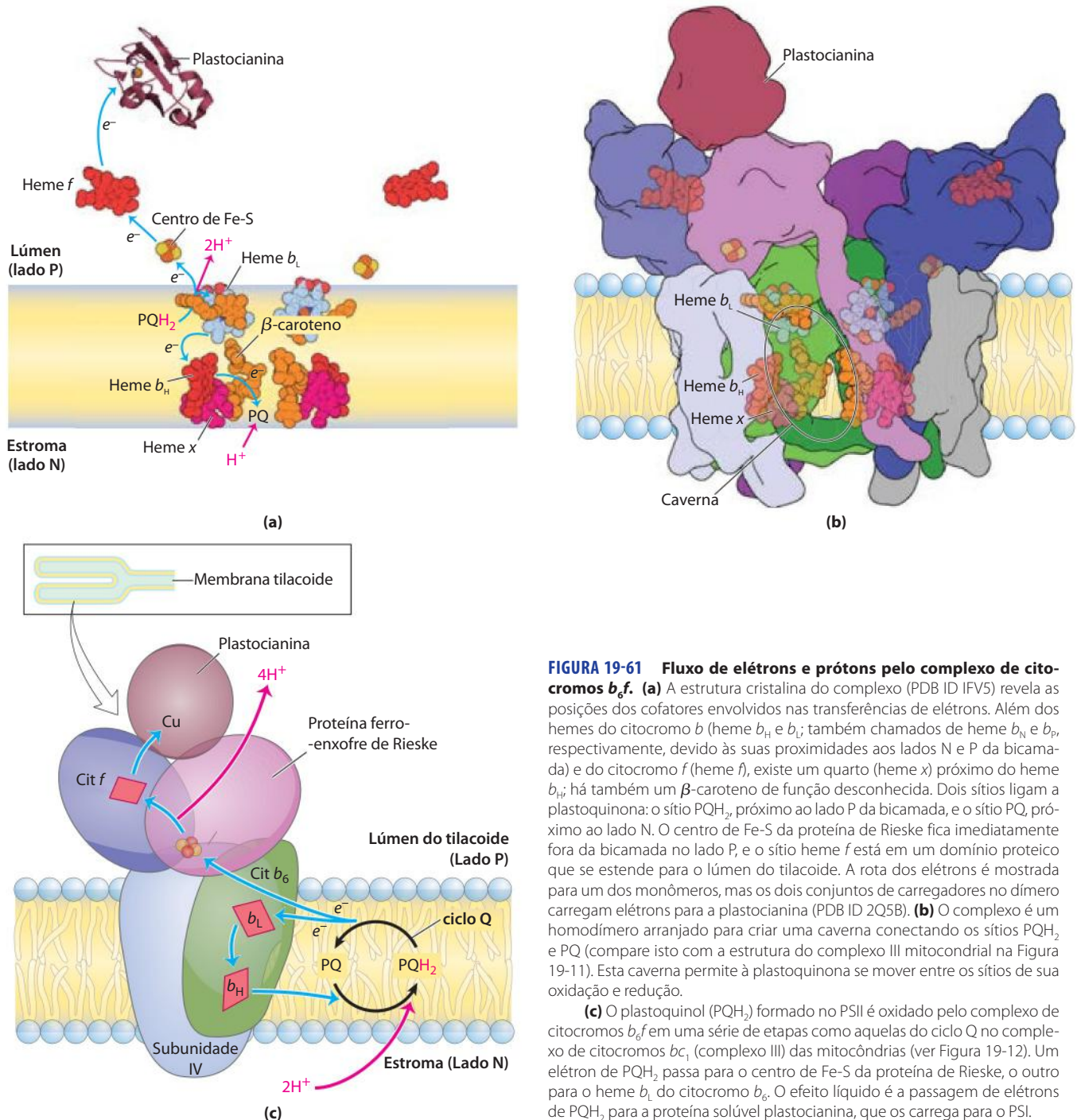



**FIGURA 19-61 Fluxo de elétrons e prótons pelo complexo de citocromos $b_6f$.** **(a)** A estrutura cristalina do complexo (PDB ID IFV5) revela as posições dos cofatores envolvidos nas transferências de elétrons. Além dos hemes do citocromo *b* (heme $b_H$ e $b_L$; também chamados de heme $b_N$ e $b_P$, respectivamente, devido às suas proximidades aos lados N e P da bicamada) e do citocromo *f* (heme *f*), existe um quarto (heme *x*) próximo do heme $b_H$; há também um β-caroteno de função desconhecida. Dois sítios ligam a plastoquinona: o sítio $PQH_2$, próximo ao lado P da bicamada, e o sítio PQ, próximo ao lado N. O centro de Fe-S da proteína de Rieske fica imediatamente fora da bicamada no lado P, e o sítio heme *f* está em um domínio proteico que se estende para o lúmen do tilacoide. A rota dos elétrons é mostrada para um dos monômeros, mas os dois conjuntos de carregadores no dímero carregam elétrons para a plastocianina (PDB ID 2Q5B). **(b)** O complexo é um homodímero arranjado para criar uma caverna conectando os sítios $PQH_2$ e PQ (compare isto com a estrutura do complexo III mitocondrial na Figura 19-11). Esta caverna permite à plastoquinona se mover entre os sítios de sua oxidação e redução.

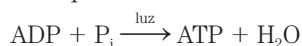
**(c)** O plastoquinol ($PQH_2$) formado no PSII é oxidado pelo complexo de citocromos $b_6f$ em uma série de etapas como aquelas do ciclo Q no complexo de citocromos $bc_1$ (complexo III) das mitocôndrias (ver Figura 19-12). Um elétron de $PQH_2$ passa para o centro de Fe-S da proteína de Rieske, o outro para o heme $b_L$ do citocromo $b_6$. O efeito líquido é a passagem de elétrons de $PQH_2$ para a proteína solúvel plastocianina, que os carrega para o PSI.

citocromo tipo *b* com dois grupos heme (denominados $b_H$ e $b_L$), proteína ferro-enxofre de Rieske ($M_r$ 20.000) e o citocromo *f* (designado a partir de *frons*, em latim, "folha"). Os elétrons fluem pelo complexo de citocromos $b_6f$ a partir de $PQ_BH_2$ para o citocromo *f*, a seguir para a plastocianina e, finalmente, para o P700, reduzindo-o.

Da mesma forma que o complexo III das mitocôndrias, o citocromo $b_6f$ conduz elétrons de uma quinona reduzida – um carregador móvel de dois elétrons, lipossolúvel (Q em mitocôndrias, $PQ_B$ em cloroplastos) – para uma proteína hidrossolúvel que carrega um elétron (citocromo *c* em mitocôndrias, plastocianina em cloroplastos). Como em mitocôndrias, a função deste complexo envolve um ciclo Q (Figura 19-12), no qual os elétrons passam, um de cada vez, de $PQ_BH_2$ para o citocromo $b_6$. Esse ciclo resulta no bombeamento de prótons através da membrana; em cloroplastos, a direção do movimento de prótons é do compartimento estromal para o lúmen do tilacoide, até quatro prótons se movendo para cada par de elétrons. O resultado é a produção de um gradiente de prótons através da membrana tilacoide à medida que os elétrons passam do PSII para o PSI. Como o volume do lúmen achatado do tilacoide é pequeno, o influxo de um pequeno número de prótons tem um efeito relativamente grande no pH do lúmen. A diferença medida no pH entre o estroma (pH 8) e o lúmen do tilacoide (pH 5) representa uma diferença de 1.000 vezes na concentração de prótons – poderosa força propulsora para a síntese de ATP.

## O fluxo cíclico de elétrons entre o PSI e o complexo de citocromos $b_6f$ aumenta a produção de ATP em relação a NADPH

O fluxo de elétrons do PSII pelo complexo de citocromos $b_6f$ e, então, pelo PSI até o $NADP^+$, algumas vezes é chamado de **fluxo acíclico de elétrons**, para distingui-lo do **fluxo cíclico de elétrons**, que ocorre em graus variáveis, dependendo principalmente das condições de luz. A via acíclica produz um gradiente de prótons, utilizado para promover a síntese de ATP, e NADPH, utilizado em processos biossintéticos redutores. O fluxo cíclico de elétrons envolve apenas o PSI, não o PSII (Figura 19-58). Os elétrons que passam do P700 para a ferredoxina não continuam até o $NADP^+$, retornando pelo complexo de citocromos $b_6f$ até a plastocianina (esta via de elétrons encontra um paralelo com aquela das bactérias verdes sulfurosas, mostrada na Figura 19-56b). A plastocianina então doa elétrons ao P700, que os transfere à ferredoxina. Dessa forma, os elétrons são reciclados repetidas vezes pelo complexo de citocromos $b_6f$ e do centro de reação do PSI, cada elétron impulsionado ao redor do ciclo pela energia de um fóton. O fluxo cíclico de elétrons não é acompanhado pela formação líquida de NADPH ou pela liberação de $O_2$. No entanto, *é* acompanhado pelo bombeamento de prótons pelo complexo de citocromos $b_6f$ e pela fosforilação de ADP a ATP, referida como **fotofosforilação cíclica**. A equação global para o fluxo cíclico de elétrons e a fotofosforilação é simplesmente

$$ADP + P_i \xrightarrow{\text{luz}} ATP + H_2O$$

A partir da regulação da partição de elétrons entre a redução do $NADP^+$ e a fotofosforilação cíclica, uma planta ajusta a razão de ATP para NADPH produzido nas reações dependentes de luz para adequar suas necessidades por estes produtos nas reações de assimilação de carbono e em outros processos biossintéticos. Como será visto no Capítulo 20, as reações de assimilação de carbono requerem ATP e NADPH em uma razão 3:2.

Essa regulação das vias de transferência de elétrons é parte de uma adaptação de curto prazo a mudanças na cor (comprimento de onda) e na quantidade (intensidade) de luz, conforme descrito a seguir.

## Transições de estado mudam a distribuição do LHCII entre os dois fotossistemas

A energia necessária para excitar o PSI (P700) é menor (luz de comprimento de onda mais longo, menor energia) do que aquela necessária para excitar o PSII (P680). Se o PSI e o PSII fossem fisicamente contíguos, os éxcitons que se originassem no sistema de antena do PSII migrariam para o centro de reação do PSI, deixando o PSII cronicamente subexcitado e interferindo com a operação do sistema de dois centros. Esse desequilíbrio no suprimento de éxcitons é impedido pela separação dos dois fotossistemas na membrana tilacoide (**Figura 19-62**). O PSII está localizado quase exclusivamente nas pilhas de membranas firmemente aderidas dos grana de tilacoides; seu complexo coletor de luz associado (LHCII) controla a forte associação das membranas adjacentes dos grana. O PSI e o complexo ATP-sintase estão localizados quase exclusivamente nas membranas tilacoides não aderidas (as lamelas estromais), onde eles têm acesso aos conteúdos do estroma, incluindo ADP e $NADP^+$. O complexo de citocromos $b_6f$ está presente primariamente nos grana.

A associação do LHCII com o PSI e o PSII depende da intensidade e do comprimento de onda da luz, os quais podem mudar no curto prazo, levando a **transições de estado** no cloroplasto. No estado 1, um resíduo crítico de Thr no LHCII não está fosforilado, e o LHCII se associa ao PSII. Sob condições de luz intensa ou azul, que favoreçam a absorção pelo PSII, o fotossistema reduz a plastoquinona a plastoquinol ($PQH_2$) mais rápido do que o PSI consegue oxidá-la. O acúmulo resultante de $PQH_2$ ativa uma proteína-cinase, que desencadeia a transição para o estado 2 pela fosforilação de um resíduo de Thr no LHCII (**Figura 19-63**). A fosforilação enfraquece a interação do LHCII com o PSII, e parte do LHCII se dissocia e se movimenta até a lamela estromal; aqui, ele captura fótons (éxcitons) para o PSI, acelerando a oxidação do $PQH_2$ e revertendo o desequilíbrio entre o fluxo de elétrons no PSI e no PSII. Em luz menos intensa (na sombra ou com mais luz vermelha), o PSI oxida o $PQH_2$ mais rápido do que o PSII consegue fazê-lo, e o aumento resultante da [PQ] desencadeia a desfosforilação do LHCII, revertendo o efeito da fosforilação.

A transição de estado na localização do LHCII é mutuamente regulada com a transição da fotofosforilação cíclica para a acíclica, descrita anteriormente; a via de elétrons é principalmente acíclica no estado 1 e principalmente cíclica no estado 2.

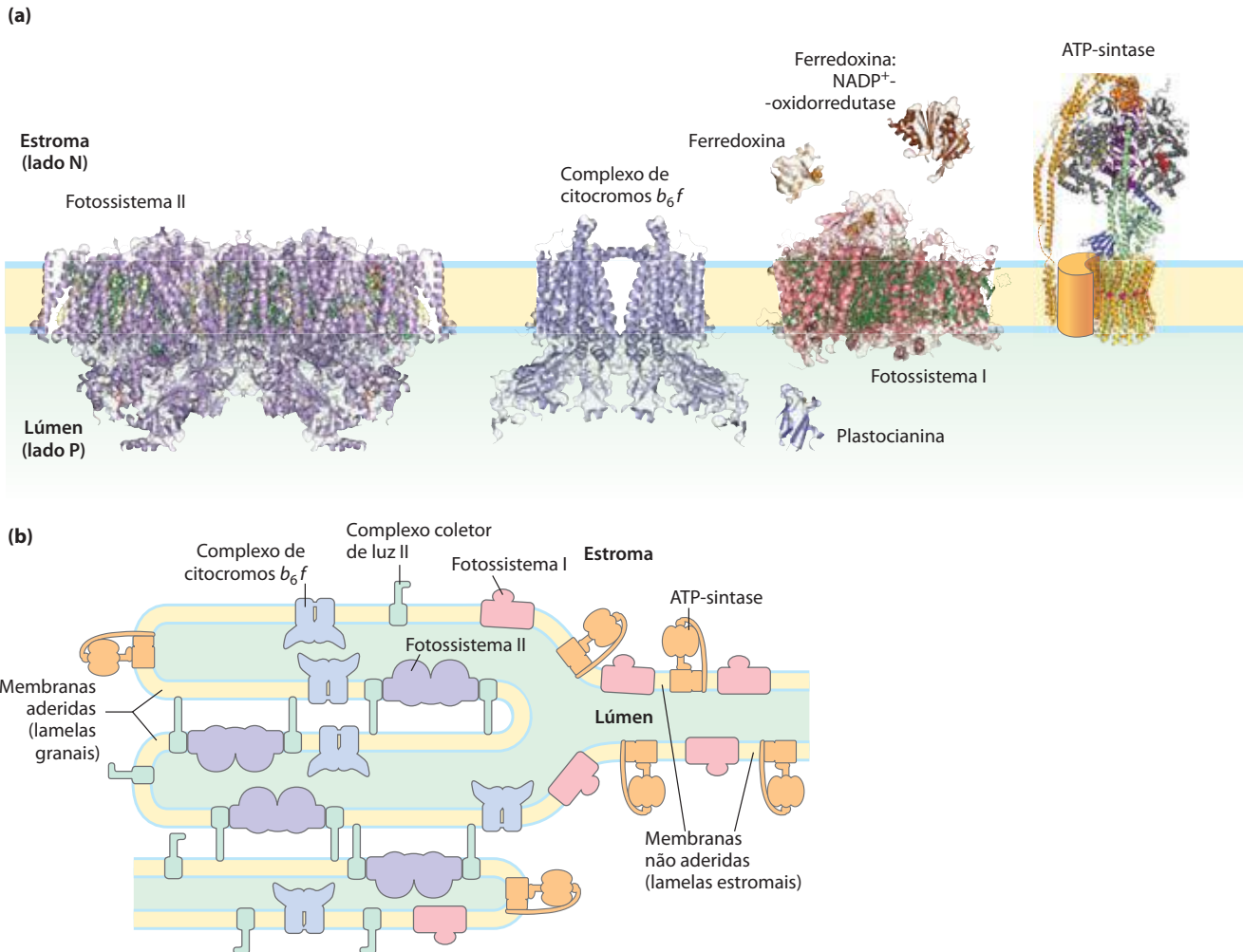



**FIGURA 19-62 Localização do PSI e do PSII nas membranas tilacoides. (a)** As estruturas dos complexos e das proteínas solúveis do aparato fotossintético de uma planta vascular ou alga, desenhadas na mesma escala. As estruturas são fotossistema II (PDB ID 2AXT), complexo de citocromos $b_{6f}$ (PDB ID 2E74), plastocianina (PDB ID 1AG6), fotossistema I (PDB ID 1QZV), ferrodoxina (PDB ID 1A70) e ferrodoxina:NADP-redutase (PDB ID 1QG0). A ATP-sintase é a composição mostrada na Figura 19-25c. **(b)** O complexo coletor de luz LHCII e a ATP-sintase estão localizados tanto nas regiões de adesão da membrana tilacoide (lamelas granais, onde várias membranas estão em contato), quanto em regiões sem adesão (lamelas estromais), e têm pleno acesso a ADP e NADP$^+$ no estroma. O PSII está presente quase exclusivamente nas regiões de adesão, e o PSI quase exclusivamente nas regiões sem adesão, exposto ao estroma. O LHCII é o "adesivo" que segura as lamelas aderidas umas às outras (ver Figura 19-63).

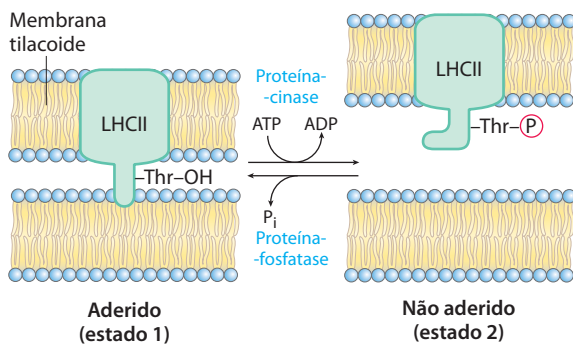



**FIGURA 19-63 Equilibrando o fluxo de elétrons no PSI e no PSII por transição de estados.** Um domínio hidrofóbico do LHCII em uma lamela tilacoide se insere na lamela vizinha e adere intimamente às duas membranas (estado 1). O acúmulo de plastoquinol (não mostrado) estimula uma proteína-cinase, que fosforila um resíduo de Tyr no domínio hidrofóbico do LHCII, reduzindo sua afinidade pela membrana tilacoide vizinha e convertendo regiões de adesão em regiões de não adesão (estado 2). Uma proteína-fosfatase específica reverte esta fosforilação regulatória quando a razão [PQ]/[$PQH_2$] aumenta.

## A água é quebrada pelo complexo de liberação de oxigênio

A fonte final de elétrons passados para o NADPH na fotossíntese de plantas (oxigênica) é a água. Tendo doado um elétron para a feofitina, o P680$^+$ (do PSII) precisa adquirir um elétron para retornar a seu estado basal, em preparação para a captura de outro fóton. A princípio, o elétron necessário pode vir de vários compostos orgânicos e inorgânicos. As bactérias fotossintéticas usam uma variedade de doado-

**FIGURA 19-64** **Atividade de quebra da água do complexo de liberação de oxigênio.** **(a)** Aqui está mostrado o processo que produz um agente oxidante de quatro elétrons – centro multinuclear com quatro íons Mn, um íon Ca e quatro átomos de oxigênio – no complexo de quebra da água do PSII. A absorção sequencial de quatro fótons (éxcitons), cada absorção causando a perda de um elétron do agrupamento de $Mn_4Ca$, produz um agente oxidante que pode remover quatro elétrons de duas moléculas de água, produzindo $O_2$. Os elétrons perdidos do agrupamento de $Mn_4Ca$ passam, um de cada vez, para um resíduo oxidado de Tyr em uma proteína do PSII e, então, para o $P680^+$. **(b)** O centro metálico do complexo de quebra da água, obtido por cristalografia por raios X (PDB ID 3ARC). $Tyr^{161}$, conhecida por participar da oxidação da água, é vista ligada por ligações de hidrogênio a uma rede de moléculas de água, incluindo diversas que estão em contato direto com o agrupamento de $Mn_4Ca$. Esse é o local de uma das reações mais importantes da biosfera!

res de elétrons com esse objetivo – acetato, succinato, malato ou sulfeto – dependendo do que está disponível em um determinado nicho ecológico. Cerca de 3 bilhões de anos atrás, a evolução das bactérias fotossintéticas primitivas (as progenitoras das cianobactérias modernas) produziu um fotossistema capaz de retirar elétrons de um doador que sempre está disponível – a água. Duas moléculas de água são quebradas, produzindo quatro elétrons, quatro prótons e oxigênio molecular:

$$2H_2O \longrightarrow 4H^+ + 4e^- + O_2$$

Um único fóton de luz visível não tem energia suficiente para quebrar as ligações na água; quatro fótons são necessários nessa reação de clivagem fotolítica.

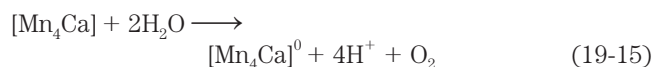
Os quatro elétrons removidos da água não passam diretamente ao $P680^+$, que só pode aceitar um elétron de cada vez. Em vez disso, um esquema molecular notável, o **complexo de liberação de oxigênio** (também chamado de **complexo de quebra da água**) passa quatro elétrons, *um de cada vez*, para o $P680^+$ (**Figura 19-64**). O doador imediato de elétrons para o $P680^+$ é um resíduo de Tyr (comumente designado como Z ou $Tyr_Z$) na subunidade D1 do centro de reação do PSII. O resíduo de Tyr perde tanto um próton quanto um elétron, gerando o radical livre eletricamente neutro de Tyr, $^\bullet$Tyr:

$$4\ P680^+ + 4\ Tyr \longrightarrow 4\ P680 + 4\ {}^\bullet Tyr \quad (19\text{-}13)$$

O radical Tyr retoma o elétron e o próton perdidos, oxidando um agrupamento de quatro íons manganês e um íon cálcio no complexo de quebra da água. A cada transferência individual de elétrons, o agrupamento de $Mn_4Ca$ se torna mais oxidado. Quatro transferências individuais de elétrons, cada uma correspondendo à absorção de um fóton, produzem uma carga de 4+ no agrupamento de $Mn_4Ca$ (Figura 19-64):

$$4\ {}^\bullet Tyr + [Mn_4Ca]^0 \longrightarrow 4\ Tyr + [Mn_4Ca]^{4+} \quad (19\text{-}14)$$

Neste estado, o agrupamento de $Mn_4Ca$ pode retirar quatro elétrons de um par de moléculas de água, liberando 4 $H^+$ e $O_2$:

$$[Mn_4Ca] + 2H_2O \longrightarrow [Mn_4Ca]^0 + 4H^+ + O_2 \quad (19\text{-}15)$$

Como os quatro prótons produzidos nesta reação são liberados no lúmen do tilacoide, o complexo de liberação de oxigênio atua como bomba de prótons, usando a energia da transferência de elétrons. A soma das equações de 19-12 a 19-15 é

$$2H_2O + 2PQ_B + 4\ \text{fótons} \longrightarrow O_2 + 2PQ_BH_2 \quad (19\text{-}16)$$

A estrutura detalhada do agrupamento de liberação de oxigênio foi obtida por cristalografia por raios X de alta resolução. O agrupamento metálico assume a forma de uma cadeira (Figura 19–64b). O assento e as pernas da cadeira são feitos por três íons Mn, um íon Ca, e quatro átomos de O. O quarto Mn e outro O formam o encosto da cadeira. Quatro moléculas de água também são vistas na estrutura cristalina, duas associadas com um dos íons Mn, as outras duas com o íon Ca. É possível que uma ou mais dessas moléculas de água seja aquela que sofre oxidação para produzir $O_2$. Esse agrupamento metálico está associado a uma proteína periférica de membrana ($M_r$ 33.000) no lado luminal da membrana tilacoide, que presumivelmente estabiliza o agrupamento. O resíduo de Tyr designado Z, por meio do qual os elétrons se movem entre a água e o centro de reação do PSII, é parte de uma rede de moléculas de água ligadas por ligações de hidrogênio, que inclui as quatro associadas com o agrupamento de $Mn_4Ca$. O mecanismo detalhado da oxidação de água pelo agrupamento de Mn4Ca não é conhecido, mas está sob intensa investigação. A reação é central à vida na Terra e pode envolver química bioinorgânica singular. A determinação da estrutura do centro polimetálico tem inspirado diversas hipóteses razoáveis e testáveis. Fique ligado.

**RESUMO 19.8 Evento fotoquímico central: fluxo de elétrons promovido pela luz**

- As bactérias têm um único centro de reação; nas bactérias púrpuras, ele é do tipo feofitina-quinona, e em bactérias verdes sulfurosas, do tipo Fe-S.
- Estudos estruturais do centro de reação de uma bactéria púrpura forneceram informações sobre o fluxo de elétrons promovido pela luz, de um par excitado especial de moléculas de clorofila, por meio da feofitina, para quinonas. Os elétrons então passam das quinonas, pelo complexo de citocromos $bc_1$, e de volta ao centro de fotorreação.
- Uma via alternativa, em bactérias verdes sulfurosas, envia elétrons de quinonas reduzidas para o $NAD^+$.
- As cianobactérias e as plantas têm dois centros de fotorreação diferentes, arranjados em sequência.
- O fotossistema I das plantas passa elétrons do seu centro de reação excitado, P700, por meio de uma série de carregadores, para a ferredoxina, que então reduz $NADP^+$ a NADPH.
- O centro de reação do fotossistema II das plantas, P680, passa elétrons para a plastoquinona, e os elétrons perdidos do P680 são repostos por elétrons de $H_2O$ (doadores de elétrons diferentes de $H_2O$ são usados em outros organismos).
- O fluxo de elétrons pelos fotossistemas produz NADPH e ATP. O fluxo cíclico de elétron produz apenas ATP e permite variabilidade nas proporções de NADPH e ATP formados.
- A localização do PSI e do PSII* entre as lamelas granais e estromais pode mudar e é indiretamente controlada pela intensidade da luz, otimizando a distribuição de éxcitons entre PSI e PSII para uma captura eficiente de energia.
- A quebra da água promovida pela luz é catalisada por um complexo proteico contendo Mn e Ca; $O_2$ é produzido. A plastoquinona reduzida carrega elétrons para o complexo de citocromos $b_6f$. Daqui eles passam para a plastocianina e então para o P700, para repor aqueles perdidos durante sua fotoexcitação.
- O fluxo de elétrons pelo complexo de citocromos $b_6f$ bombeia prótons através da membrana plasmática, criando uma força próton-motriz que fornece a energia para a síntese de ATP por uma ATP-sintase.

## 19.9 Síntese de ATP pela fotofosforilação

A atividade combinada dos dois fotossistemas vegetais move elétrons da água ao $NADP^+$, conservando parte da energia da luz absorvida como NADPH (Figura 19-58). Simultaneamente, prótons são bombeados através da membrana tilacoide e energia é conservada na forma de um potencial eletroquímico. Agora será apresentado o processo pelo qual esse gradiente de prótons permite a síntese de ATP, o outro produto de conservação de energia das reações dependentes de luz.

Daniel Arnon, 1910-1994

Em 1954, Daniel Arnon e colaboradores descobriram que ATP é gerado a partir de ADP e $P_i$ durante a transferência fotossintética de elétrons em cloroplastos de espinafre iluminados. Apoio para essas descobertas veio do trabalho de Albert Frenkel, que detectou produção de ATP dependente de luz em estruturas membranáceas contendo pigmentos, chamadas de **cromatóforos**, derivadas de bactérias fotossintéticas. Os pesquisadores concluíram que parte da energia luminosa capturada pelos sistemas fotossintéticos desses organismos é transformada em energia de ligação fosfato do ATP. Esse processo é chamado de **fotofosforilação**, para distingui-lo da fosforilação oxidativa em mitocôndrias durante a respiração.

### Um gradiente de prótons acopla o fluxo de elétrons e a fosforilação

Diversas propriedades da transferência fotossintética de elétrons e da fotofosforilação em cloroplastos indicam que um gradiente de prótons desempenha o mesmo papel que na fosforilação oxidativa mitocondrial. (1) Os centros de reação, os carregadores de elétrons e as enzimas formadoras de ATP estão localizados em uma membrana impermeável a prótons – a membrana tilacoide – que precisa estar intacta para sustentar a fotofosforilação. (2) A fotofosforilação pode ser desacoplada do fluxo de elétrons por reagentes que promovem a passagem de prótons através da membrana tilacoide. (3) A fotofosforilação pode ser bloqueada por venturicidina e agentes semelhantes, que inibem a formação de ATP a partir de ADP e $P_i$ pela ATP-sintase mitocondrial (Tabela 19-4). (4) A síntese de ATP é catalisada por complexos $F_oF_1$, localizados na superfície externa das membranas tilacoides e muito semelhantes em estrutura e função aos complexos $F_oF_1$ das mitocôndrias.

Moléculas transferidoras de elétrons na cadeia de carregadores que conecta o PSII e o PSI são assimetricamente orientadas na membrana tilacoide, de forma que o fluxo fotoinduzido de elétrons resulta no movimento líquido de prótons através da membrana, do lado estromal para o lúmen do tilacoide (**Figura 19-65**). Em 1966, André Jagendorf mostrou que um gradiente de pH através da membrana tilacoide (alcalina do lado de fora) poderia fornecer a força propulsora para gerar ATP. Essas observações iniciais de Jagendorf proporcionaram algumas das evidências experimentais mais importantes a favor da hipótese quimiosmótica de Mitchell.

* N. de T. Os autores se referem à localização do LHCII e não de PSI e PSII. Estes não têm mobilidade, ao contrário do LHCII, cuja posição em relação aos fotossistemas é modulada pela intensidade e pelo comprimento de onda da luz (conforme descrito no texto sobre transição de estados).

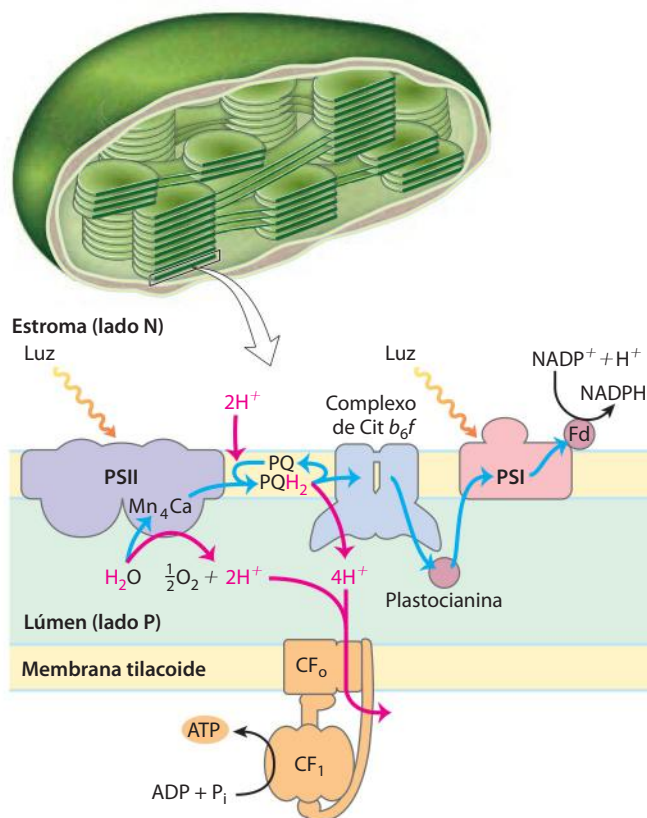
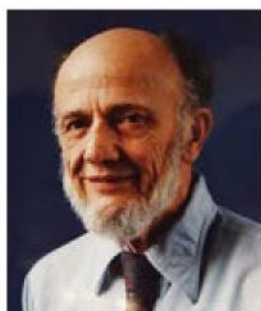



**FIGURA 19-65 Circuitos de prótons e de elétrons durante a fotofosforilação.** Os elétrons (setas azuis) se movem da água, por meio do PSII, da cadeia intermediária de carregadores e do PSI, chegando finalmente ao $NADP^+$. Os prótons (setas vermelhas) são bombeados para o lúmen do tilacoide pelo fluxo de elétrons por meio de carregadores que ligam o PSII e o PSI, entrando novamente no estroma através de canais de prótons formados pelo $F_o$ (designado como $CF_o$) da ATP-sintase. A subunidade $F_1$ ($CF_1$) catalisa a síntese de ATP.

André Jagendorf

Jagendorf incubou cloroplastos no escuro em tampão de pH 4; o tampão penetrou lentamente no compartimento interno dos tilacoides, diminuindo seu pH interno. Ele adicionou ADP e $P_i$ na suspensão de cloroplastos no escuro e, então, de repente, aumentou o pH do meio externo para 9, momentaneamente criando um grande gradiente de pH através da membrana. À medida que os prótons saíam dos tilacoides em direção ao meio, ATP era gerado a partir de ADP e $P_i$. Como a formação de ATP ocorria no escuro (sem acréscimo de energia pela luz), esse experimento mostrou que um gradiente de pH através da membrana é um estado de alta energia que, da mesma forma que na fosforilação oxidativa mitocondrial, pode mediar a transdução de energia da transferência de elétrons em energia química do ATP.

## A estequiometria aproximada da fotofosforilação foi estabelecida

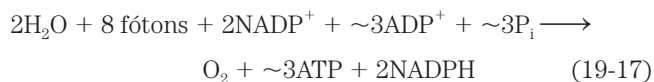
À medida que os elétrons se deslocam da água para o $NADP^+$ nos cloroplastos vegetais, cerca de 12 $H^+$ movimentam-se do estroma para o lúmen do tilacoide para cada quatro elétrons que passam (ou seja, por $O_2$ formado). Quatro desses prótons são transportados pelo complexo de liberação de oxigênio e até oito pelo complexo de citocromos $b_6f$. O resultado mensurável é uma diferença de 1.000 vezes na concentração de prótons através da membrana tilacoide ($\Delta pH = 3$). Lembre-se de que a energia estocada em um gradiente de prótons (o potencial eletroquímico) tem dois componentes: uma diferença na concentração de prótons ($\Delta pH$) e um potencial elétrico ($\Delta\psi$) devido à separação de cargas. Em cloroplastos, o $\Delta pH$ é o componente dominante; o movimento de contra-íons aparentemente dissipa a maior parte do potencial elétrico. Em cloroplastos iluminados, a energia estocada no gradiente por mol de prótons é

$$\Delta G = 2{,}3RT\ \Delta pH + Z\mathcal{F}\ \Delta\psi = -17\ \text{kJ/mol}$$

de forma que o movimento de 12 mols de prótons através da membrana tilacoide representa uma conservação de cerca de 200 kJ de energia – energia suficiente para promover a síntese de vários moles de ATP ($\Delta G'^\circ = 30{,}5$ kJ/mol). Medidas experimentais fornecem valores de cerca de 3 ATP por $O_2$ produzido.

Pelo menos oito fótons precisam ser absorvidos para impulsionar quatro elétrons da $H_2O$ até o NADPH (um fóton por elétron em cada centro de reação). A energia em oito fótons de luz visível é mais do que suficiente para a síntese de três moléculas de ATP.

A síntese de ATP não é a única reação de conservação de energia da fotossíntese em plantas; o NADPH formado ao final da transferência de elétrons também é energeticamente rico. A equação geral para a fotofosforilação acíclica (um termo explicado a seguir) é

$$2H_2O + 8\ \text{fótons} + 2NADP^+ + {\sim}3ADP^+ + {\sim}3P_i \longrightarrow O_2 + {\sim}3ATP + 2NADPH \qquad (19\text{-}17)$$

## A ATP-sintase dos cloroplastos é semelhante àquela das mitocôndrias

A enzima responsável pela síntese de ATP nos cloroplastos é um grande complexo com dois componentes funcionais, $CF_o$ e $CF_1$ (*C* designando sua localização nos cloroplastos). $CF_o$ é um poro transmembrana de prótons, composto por várias proteínas integrais de membrana e homólogo ao $F_o$ mitocondrial. $CF_1$ é um complexo proteico periférico de membrana, muito similar na composição, na estrutura e na função das subunidades ao $F_1$ mitocondrial.

A microscopia eletrônica de secções de cloroplastos mostra os complexos de ATP-sintase como projeções arredondadas na superfície *externa* (estromal ou N) das membranas tilacoides; esses complexos correspondem aos complexos de ATP-sintase vistos como projeções na superfície *interna* (matriz ou N) da membrana mitocondrial interna. Assim, a relação entre a orientação da ATP-sintase e a direção do bombeamento de prótons é a mesma nos cloroplastos e nas mitocôndrias. Em ambos os casos, a porção $F_1$ da ATP-sintase está localizada no lado mais alcalino (N) da membrana, pela qual prótons fluem a favor do gradiente de concentração; a direção do fluxo de prótons em relação a $F_1$ é a mesma em ambos os casos: de P para N (**Figura 19-66**).

Acredita-se que o mecanismo da ATP-sintase dos cloroplastos também seja essencialmente idêntico àquele de sua análoga mitocondrial; ADP e $P_i$ prontamente se condensam para formar ATP na superfície da enzima, e a liberação deste ATP ligado à enzima requer uma força próton-motriz. A catálise rotacional sequencialmente envolve cada uma das três subunidades $\beta$ da ATP-sintase na síntese de ATP, na liberação de ATP e na ligação de ADP + $P_i$ (Figuras 19-26 e 19-27).

Prediz-se que a ATP-sintase do cloroplasto de espinafre, com 14 subunidades c em seu complexo $F_o$, tenha uma razão de ATP formado para elétrons transferidos menor, comparada com os complexos $F_o$ de bovinos, leveduras e *E. coli*, com 8, 10, e 10 subunidades c, respectivamente (Figura 19–29).

## RESUMO 19.9 Síntese de ATP pela fotofosforilação

- Em plantas, tanto a reação de quebra da água quanto o fluxo de elétrons pelo complexo de citocromos $b_6f$ são acompanhados pelo bombeamento de prótons através da membrana tilacoide. A força próton-motriz assim criada promove a síntese de ATP por um complexo $CF_oCF_1$ similar ao complexo $F_oF_1$ mitocondrial.

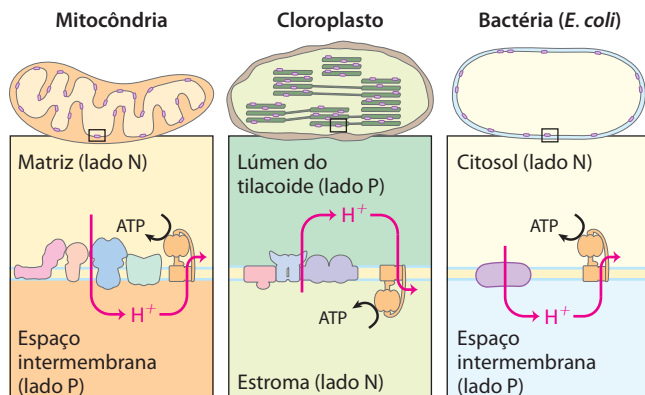



**FIGURA 19-66 Comparação da topologia do movimento de prótons e da orientação da ATP-sintase nas membranas de mitocôndrias, cloroplastos e da bactéria *E. coli*.** Em cada caso, a orientação do gradiente de prótons em relação à atividade da ATP-sintase é a mesma.

- O mecanismo catalítico do $CF_oCF_1$ é muito similar ao de ATP-sintases de mitocôndrias e bactérias. A rotação física promovida pelo gradiente de prótons é acompanhada pela síntese de ATP em sítios que se alternam entre três conformações, uma com alta afinidade por ATP, uma com alta afinidade por ADP e $P_i$ e uma com baixa afinidade pelos dois nucleotídeos.

## 19.10 Evolução da fotossíntese oxigênica

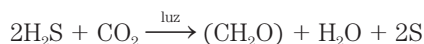
O aparecimento da fotossíntese oxigênica na Terra há cerca de 2,5 bilhões de anos foi um evento crucial na evolução da biosfera. Até então, a Terra estava essencialmente desprovida de oxigênio molecular e carecia da camada de ozônio que protege os organismos vivos da radiação UV solar. A fotossíntese oxigênica tornou disponível um suprimento quase ilimitado de agente redutor ($H_2O$) para promover a produção de compostos orgânicos por reações biossintéticas redutoras. Os mecanismos evoluíram, permitindo aos organismos usar $O_2$ como aceptor final de elétrons em transferências de elétrons altamente energéticas a partir de substratos orgânicos, empregando a energia da oxidação para sustentar seu metabolismo. O complexo aparato fotossintético de uma planta vascular moderna é a culminação de uma série de eventos evolutivos, o mais recente sendo a aquisição, por células eucarióticas, de um endossimbionte cianobacteriano.

### Os cloroplastos evoluíram a partir de antigas bactérias fotossintéticas

Os cloroplastos em organismos modernos lembram as mitocôndrias em diversas propriedades e acredita-se que tenham se originado pelo mesmo mecanismo que deu origem às mitocôndrias: endossimbiose. Da mesma forma que as mitocôndrias, os cloroplastos contêm seu próprio DNA e sua própria maquinaria de síntese proteica. Alguns dos polipeptídeos das proteínas dos cloroplastos são codificados por genes dos cloroplastos e sintetizados nos cloroplastos; outros são codificados por genes nucleares, sintetizados fora dos cloroplastos e importados (Capítulo 27). Quando as células vegetais crescem e se dividem, os cloroplastos dão origem a novos cloroplastos por divisão, durante a qual seu DNA é replicado e dividido entre os cloroplastos-filhos. A maquinaria e o mecanismo de captura de luz, fluxo de elétrons e síntese de ATP em cianobactérias modernas são semelhantes em muitos aspectos àqueles dos cloroplastos vegetais. Essas observações levaram à hipótese hoje amplamente aceita de que os progenitores evolutivos das células vegetais modernas são eucariotos primitivos que englobaram cianobactérias fotossintéticas e estabeleceram relações endossimbióticas estáveis com elas (ver Figura 1-38).

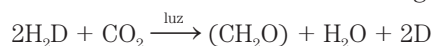
Pelo menos metade da atividade fotossintética na Terra hoje ocorre em microrganismos – algas, outros eucariotos fotossintéticos e bactérias fotossintéticas. As cianobactérias têm PSII e PSI em sequência, e o PSII tem

uma atividade de quebra de água associada que lembra aquela das plantas. No entanto, os outros grupos de bactérias fotossintéticas têm apenas um centro de reação e não quebram água ou produzem $O_2$. Muitos são anaeróbios obrigatórios e não toleram $O_2$; eles precisam usar um outro composto que não seja a água como doador de elétrons. Algumas bactérias fotossintéticas usam compostos inorgânicos como doadores de elétrons (e de hidrogênio). Por exemplos, as bactérias verdes sulfurosas usam sulfeto de hidrogênio:

$$2H_2S + CO_2 \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + H_2O + 2S$$

Estas bactérias, em vez de produzirem $O_2$ molecular, formam enxofre elementar como produto da oxidação do $H_2S$. (Elas posteriormente oxidam o S a $SO_4^{2-}$.) Outras bactérias fotossintéticas usam compostos orgânicos como o lactato como doadores de elétrons:

$$2 \text{ lactato} + CO_2 \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + H_2O + 2 \text{ piruvato}$$

A semelhança fundamental entre a fotossíntese das plantas e das bactérias, apesar das diferenças nos doadores de elétrons que elas utilizam, se torna mais óbvia quando a equação da fotossíntese é escrita na sua forma mais geral

$$2H_2D + CO_2 \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + H_2O + 2D$$

na qual $H_2D$ é um doador de elétrons (e de hidrogênio) e D é sua forma oxidada. $H_2D$ pode ser água, sulfeto de hidrogênio, lactato ou algum outro composto orgânico, dependendo da espécie. Muito provavelmente, as bactérias inicialmente desenvolveram a capacidade fotossintética usando $H_2S$ como fonte de elétrons.

Os parentes antigos das cianobactérias modernas provavelmente tenham surgido da combinação do material genético de dois tipos de bactérias fotossintéticas, com sistemas do tipo observado em bactérias púrpuras modernas (com via de elétrons do tipo PSII) e em bactérias verdes sulfurosas (com via de elétrons que lembra aquela do PSI). A bactéria com dois fotossistemas independentes pode ter usado um deles em um determinado conjunto de condições e outro em condições diferentes. Ao longo do tempo, um mecanismo para conectar os dois fotossistemas para uso simultâneo evoluiu, e o sistema tipo PSII adquiriu a capacidade, encontrada em cianobactérias modernas, de quebrar a água.

As cianobactérias modernas podem sintetizar ATP por fosforilação oxidativa ou por fotofosforilação, embora não tenham nem mitocôndrias e nem cloroplastos. A maquinaria enzimática para ambos os processos está em uma membrana plasmática altamente convoluta (**Figura 19-67**). Três componentes proteicos funcionam nos dois processos, fornecendo evidências de que tenham uma origem evolutiva comum (**Figura 19-68**). Primeiro, o complexo capaz de bombear prótons, constituído pelos citocromos $b_6f$, carrega elétrons da plastoquinona para o citocromo $c_6$ na fotossíntese e também carrega elétrons da ubiquinona para o citocromo $c_6$ na fosforilação oxidativa – o papel desempenhado pelo citocromo $bc_1$ nas mitocôndrias. Segundo, o citocromo $c_6$, homólogo ao citocromo $c$ mitocondrial, carrega elétrons do complexo III para o complexo IV em cianobactérias; ele também pode carregar elétrons do complexo de citocromos $b_6f$ para o PSI – papel desempenhado em plantas pela plastocianina. Vê-se, portanto, a homologia funcional entre o complexo de citocromos $b_6f$ cianobacteriano e o complexo de citocromos $bc_1$ mitocondrial, e entre o citocromo $c_6$ cianobacteriano e a plastocianina vegetal. O terceiro componente conservado é a ATP-sintase, que funciona na fosforilação oxidativa e na fotofosforilação em cianobactérias e nas mitocôndrias e nos cloroplastos de eucariotos fotossintéticos. A estrutura e o mecanismo notável dessa enzima foram fortemente conservados ao longo da evolução.

**FIGURA 19-67 As membranas fotossintéticas de uma cianobactéria.** Nestes cortes finos de uma cianobactéria, vistos por microscopia eletrônica de transmissão, as múltiplas camadas das membranas internas são vistas preenchendo metade do volume total da célula. O amplo sistema de membranas cumpre a mesma função dos tilacoides das plantas vasculares, proporcionando uma grande área de superfície, que contém toda a maquinaria fotossintética. (Barra = 100 nm.)

## Em *Halobacterium*, uma só proteína absorve luz e bombeia prótons para promover a síntese de ATP

Em certas arqueobactérias modernas, evoluiu um mecanismo bastante diferente para converter a energia da luz em gradiente eletroquímico. A arqueobactéria halofílica ("apreciadora de sal") *Halobacterium salinarum* descende de progenitores evolutivos antigos. Essa arqueobactéria (comumente referida como halobactéria) vive apenas em lagoas e lagos salgados (o *Great Salt Lake* e o Mar Morto,

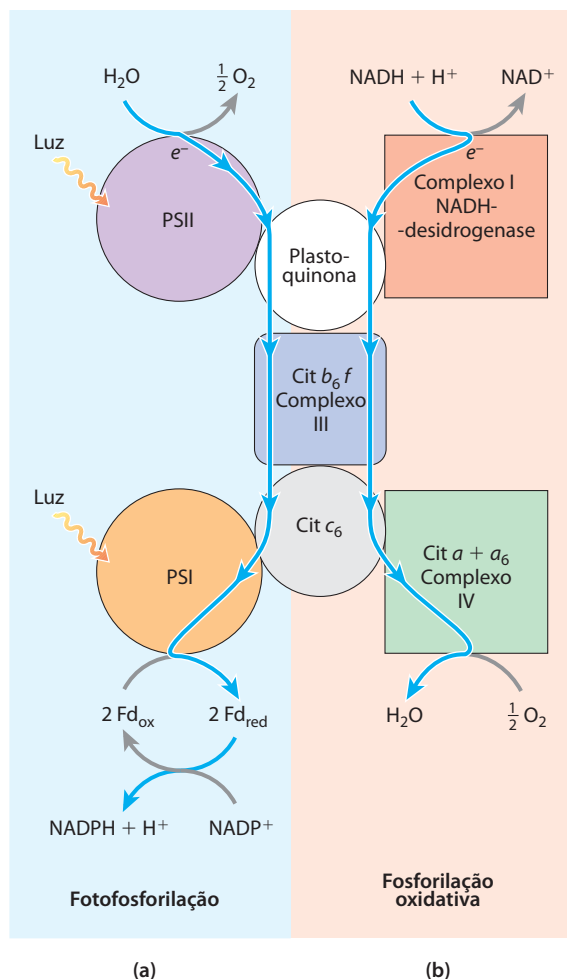



**FIGURA 19-68 Os papéis duplos dos citocromos $b_6f$ e do citocromo $c_6$ em cianobactérias refletem origens evolutivas.** As cianobactérias usam os citocromos $b_6f$, o citocromo $c_6$ e a plastoquinona tanto para a fosforilação oxidativa quanto para a fotofosforilação. **(a)** Na fotofosforilação, os elétrons fluem (da parte superior para a inferior) da água para o $NADP^+$. **(b)** Na fosforilação oxidativa, os elétrons fluem do NADH para o $O_2$. Ambos os processos são acompanhados pelo movimento de prótons através da membrana, realizado por um ciclo Q.

por exemplo), onde a alta concentração de sal – que pode exceder 4 M – resulta da perda de água por evaporação; na verdade, as halobactérias não podem viver em concentrações de NaCl menores do que 3 M. Esses organismos são aeróbios e normalmente usam o $O_2$ para oxidar moléculas combustíveis orgânicas. No entanto, a solubilidade do $O_2$ é tão baixa em lagoas salgadas que algumas vezes o metabolismo oxidativo precisa ser suplementado pela luz solar como fonte alternativa de energia.

A membrana plasmática de *H. salinarum* apresenta porções que contêm o pigmento de absorção de luz **bacteriorrodopsina**, o qual contém retinal (o derivado aldeído da vitamina A; ver Figura 10-21) como um grupo prostético capaz de absorver luz. Quando as células são iluminadas, o retinal-todo-*trans* ligado à bacteriorrodopsina absorve um fóton e sofre fotoisomerização para retinal-13-*cis*, forçando uma mudança conformacional na proteína. A restauração do retinal-todo-*trans* é acompanhada pelo movimento de saída de prótons através da membrana plasmática. A bacteriorrodopsina, com apenas 247 resíduos de aminoácidos, é a bomba de prótons mais simples impulsionada pela luz que se conhece. A diferença na estrutura tridimensional da bacteriorrodopsina no escuro e depois da iluminação (**Figura 19-69a**) sugere uma via pela qual uma série de saltos de prótons em concerto poderia efetivamente mover um próton através da membrana. O cromóforo retinal está ligado por uma ligação via base de Schiff ao grupo $\varepsilon$-amino de um resíduo de Lys. No escuro, o nitrogênio dessa base de Schiff está protonado; quando iluminado, a fotoisomerização do retinal baixa o $pK_a$ desse grupo, e ele libera seu próton para um resíduo de Asp próximo, desencadeando uma série de saltos laterais de prótons que acabam resultando na liberação de um próton na superfície externa da membrana (Figura 19-69b).

O potencial eletroquímico através da membrana promove a volta dos prótons para dentro da célula por meio de um complexo de ATP-sintase de membrana muito similar àquele das mitocôndrias e dos cloroplastos. Assim, quando o $O_2$ é limitado, as halobactérias podem usar a luz para suplementar o ATP sintetizado pela fosforilação oxidativa. As halobactérias não liberam $O_2$ e nem realizam a fotorredução do $NADP^+$; sua maquinaria de fototransdução é, portanto, muito mais simples do que aquela de cianobactérias ou plantas. No entanto, seu mecanismo de bombeamento de prótons pode se revelar um protótipo para muitas outras bombas de íons mais complexas. **Bacteriorrodopsina**

## RESUMO 19.10 Evolução da fotossíntese oxigênica

- As cianobactérias modernas são derivadas de um organismo antigo que adquiriu dois fotossistemas, um do tipo encontrado hoje em bactérias púrpuras, e o outro do tipo encontrado em bactérias verdes sulfurosas.
- Muitos microrganismos fotossintéticos obtêm elétrons para a fotossíntese não da água, mas de doadores como $H_2S$.
- As cianobactérias, com os fotossistemas em sequência e com uma atividade de quebra de água que liberou oxigênio para a atmosfera, apareceram na Terra há cerca de 2,5 bilhões de anos.
- Os cloroplastos, assim como as mitocôndrias, evoluíram de bactérias vivendo endossimbioticamente em células eucarióticas primitivas. As ATP-sintases de bactérias, cianobactérias, mitocôndrias e cloroplastos compartilham um precursor evolutivo e um mecanismo enzimático comum.
- Um mecanismo inteiramente diferente para converter a energia da luz em um gradiente de prótons evoluiu em arqueobactérias modernas, no qual o pigmento coletor de luz é o retinal.

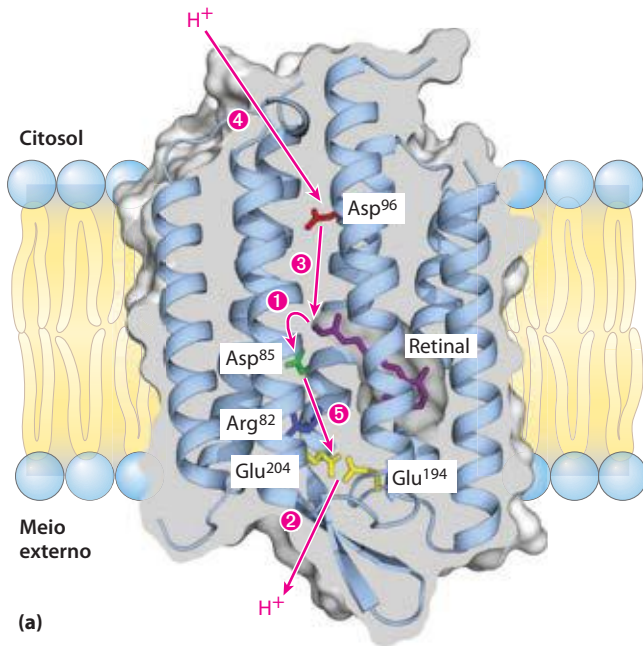



**FIGURA 19-66 Um mecanismo diferente para o bombeamento de prótons evoluiu independentemente em uma arqueobactéria halofílica. (a)** A bacteriorrodopsina ($M_r$ 26.000) de *Halobacterium halobium* tem sete hélices $\alpha$ que atravessam a membrana (PDB ID 1C8R). O cromóforo retinal-todo-*trans* (em púrpura) está covalentemente ligado por meio de uma base de Schiff ao grupo $\varepsilon$-amino de um resíduo de Lys bem no interior da membrana. Ao longo da proteína estão uma série de resíduos de Asp e Glu e uma série de moléculas de água proximamente associadas que, juntas, fornecem a via transmembrana para prótons (setas cor-de-rosa). As etapas de ❶ a ❺ indicam movimentos de prótons, descritos a seguir.

**(b)** No escuro (painel da esquerda), a base de Schiff está protonada. A iluminação (painel da direita) fotoisomeriza o retinal, forçando mudanças conformacionais sutis na proteína que alteram a distância entre a base de Schiff e seus resíduos de aminoácidos vizinhos. A interação com estes vizinhos (Leu$^{93}$ e Val$^{49}$) baixa o p$K_a$ da base e Schiff protonada, e a base doa seu próton a um grupo carboxil próximo no Asp$^{85}$ [etapa ❶ em (a)]. Isso inicia uma série de saltos laterais em concerto de prótons entre moléculas de água (ver Figura 2-14) no interior da proteína, que termina com ❷ a liberação de um próton que estava sendo partilhado por Glu$^{194}$ e Glu$^{204}$ perto da superfície extracelular (Tyr$^{83}$ forma uma ligação de hidrogênio com Glu$^{194}$, que facilita esta liberação de prótons). ❸ A base de Schiff readquire um próton do Asp$^{96}$, o qual ❹ retira um próton do citosol. ❺ Finalmente, o Asp$^{85}$ doa seu próton, levando a uma nova protonação do par Glu$^{204}$-Glu$^{194}$. Este sistema está agora pronto para outra rodada de bombeamento de próton.

## Termos-chave

*Os termos em negrito estão definidos no glossário.*

## Leituras adicionais

### História e antecedentes gerais

**Arnon, D.I.** (1984) The discovery of photosynthetic phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* **9**, 258–262.

**Harold, F.M.** (1986) *The Vital Force: A Study in Bioenergetics*, W.H. Freeman and Company, New York.

Uma síntese de fácil leitura dos princípios da bioenergética e suas aplicações para as transduções de energia.

**Heldt, H.-W. & Piechulla, B.** (2010) *Plant Biochemistry*, 4th edn, Elsevier, New York.

Um livro-texto de bioquímica vegetal com excelentes discussões sobre a fotofosforilação.

**Lane, N.** (2005) *Power, Sex, Suicide: Mitochondria and the Meaning of Life*, Oxford University Press, Oxford.

Uma descrição introdutória dos papéis das mitocôndrias na conservação da energia e na apoptose.

**Mitchell, P.** (1979) Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* **206**, 1148–1159.

A aula do Nobel de Mitchell, delineando a evolução da hipótese quimiosmótica.

**Scheffler, I.E.** (2008) *Mitochondria*, 2nd edn, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.

Um excelente levantamento sobre a estrutura e o funcionamento da mitocôndria.

**Slater, E.C.** (1987) The mechanism of the conservation of energy of biological oxidations. *Eur. J. Biochem.* **166**, 489–504.

Uma descrição clara e crítica da evolução do modelo quimiosmótico.

## FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

### Reações de transferência de elétrons em mitocôndrias

**Adam-Vizi, V. & Chinopoulos, C.** (2006) Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol.* **27**, 639–645.

**Cramer, W.A., Hasan, S.S., & Yamashita, E.** (2011) The Q cycle of cytochrome *bc* complexes: a structure perspective. *Biochim. Biophys. Acta* **1807**, 788–802.

Uma discussão avançada sobre o ciclo Q na fosforilação oxidativa e fotofosforilação.

**Dudkina, N.V., Kouřil, R., Peters, K., Braun, H.-P., & Boekema, E.J.** (2010) Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochim. Biophys. Acta* **1797,** 664–670**.**

**Efremov, R.S., Baradaran, R., & Sazanov, L.A.** (2010) The architecture of respiratory complex I. *Nature* **465**, 441–447.

**Hamanaka, R.B. & Chandel, N.S.** (2010) Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 505-513.

**Millar, A.H., Whelan, J., Soole, K.L., & Day, D.A.** (2011) Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **62**, 79–104.

**Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., & Rao, Z.** (2005) Crystal structure of mitochondrial respiratory protein Complex II. *Cell* **121**, 1043–1057.

**Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., & Yoshikawa, S.** (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science* **272**, 1136–1144.

A solução por cristalografia por raios X da estrutura desta enorme proteína de membrana.

**Xia, D., Yu, C.-A., Kim, H., Xia, J.-Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L., & Deisenhofer, J.** (1997) Crystal structure of the cytochrome $bc_1$ complex from bovine heart mitochondria. *Science* **277**, 60–66.

Um relato revelando a estrutura cristalográfica do complexo III.

**Yoshikawa, S., Muramoto, K., & Shinzawa-Itoh, K.** (2011) Proton-pumping mechanism of cytochrome *c* oxidase. *Annu. Rev. Biophys.* **40**, 205–223.

### Síntese de ATP

**Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R., & Walker, J.E.** (1994) The structure of F1-ATPase from bovine heart mitochondria determined at 2.8 Å resolution. *Nature* **370**, 621–628.

**Boyer, P.D.** (1997) The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 717–749.

Uma descrição do desenvolvimento histórico e do estado atual do modelo de troca de ligação, escrito por seu principal arquiteto.

**Hinkle, P.C., Kumar, M.A., Resetar, A., & Harris, D.L.** (1991) Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemistry* **30**, 3576–3582.

Uma análise cuidadosa dos resultados experimentais e das considerações teóricas sobre a questão de razões P/O não integrais.

**Okuno, D., Iino, R., & Noji, H.** (2011) Rotation and structure of FoF1-ATP synthase. *J. Biochem.* **149**, 655–664.

**Silverstein, T.** (2005) The mitochondrial phosphate-to-oxygen ratio is not an integer. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **33**, 416–417.

**von Ballmoos, C., Wiedenmann, A., & Dimroth, P.** (2009) Essentials for ATP synthesis by $F_1F_o$ ATP synthase. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 649–672.

**Watt, I.N., Montgomery, M.G., Runswick M.J. Leslie, A.G.W., & Walker, J.E.** (2010) Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 16,823–16,827.

### Regulação da fosforilação oxidativa

**Taylor, C.T.** (2008) Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. *Biochem. J.* **409**, 19–26.

### Mitocôndrias na termogênese, na síntese de esteroides e na apoptose

**Azzu, V. & Brand, M.D.** (2010) The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends Biochem. Sci.* 35, 298–307.

Revisão de nível intermediário de como o frio, a superalimentação e a fome afetam a expressão de genes da termogenina.

**Wang, C. & Youle, R.J.** (2009) The role of mitochondria in apoptosis. *Annu.*
*Rev. Genet.* **43**, 95–118.

### Genes mitocondriais: suas origens e efeitos das mutações

**Abou-Sleiman, P.M., Muqit, M.M.K., & Wood, N.W.** (2006) Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci*. **7**, 207–219.

**Becker, T., Böttinger, L., & Pfanner, N.** (2012) Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 85–91.

Revisão de nível intermediário de como as proteínas codificadas pelo núcleo chegam às mitocôndrias.

**Chen, Z.J. & Butow, R.A.** (2005) The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 815–825.

Revisão de nível intermediário.

**Seyfried, T.N. & Shelton, L.M.** (2010) Cancer as a metabolic disease. *Nutr. Metab.* **7**, 7–29.

Metabolismo energético danificado é típico de uma ampla variedade de cânceres; uma revisão do papel das mitocôndrias.

## FOTOSSÍNTESE

### Fluxo de elétrons promovido pela luz

**Barber, J. & Anderson, J.M. (eds).** (2002) Photosystem II: Molecular Structure and Function. Proceedings of a Meeting, 13–14 March 2002. *Philos. Trans. R. Soc. (Biol. Sci.)* **357** (1426).

Uma coletânea de 16 artigos sobre o fotossistema II.

*Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* (2007) **1767** (6).

Este número de periódico contém 10 revisões sobre a estrutura e a função dos fotossistemas.

**Busch, A. & Hipler, M.** (2011) The structure and function of eukaryotic photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* **1807**, 864–877.

**Huber, R.** (1990) A structural basis of light energy and electron transfer in biology. *Eur. J. Biochem.* **187**, 283–305.

Aula do Nobel de Huber, descrevendo a química e a física das fototransduções; discussão excepcionalmente clara e bem ilustrada, com base em estudos cristalográficos dos centros de reação.

**Johnson, G.N.** (2011) Physiology of PSI cyclic electron transport in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1807**, 906–911.

Revisão das vias e funções da fotofosforilação cíclica.

**Kramer, D.M., Avenson, T.J., & Edwards, G.E.** (2007) Dynamic flexibility in the light reactions of photosynthesis governed by both electron and proton transfer reactions. *Trends Plant Sci*. **9**, 349–357.

Revisão de nível intermediário sobre a regulação das transições de estado.

**Rochaix, J.-D.** (2011) Regulation of photosynthetic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta* **1807**, 878–886.

Revisão de nível intermediário sobre as respostas das plantas a mudanças na qualidade e quantidade de luz.

**Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.-R., & Kamiya, N.** (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature* **473**, 55–61.

### Síntese de ATP por fotofosforilação

**Jagendorf, A.T.** (1967) Acid-base transitions and phosphorylation by chloroplasts. *Fed. Proc.* **26**, 1361–1369.

Experimento clássico estabelecendo a capacidade de um gradiente de prótons em promover a síntese de ATP no escuro.

### Evolução da fotossíntese oxigênica

**Hohmann-Marriott, M.F. & Blankenship, R.E.** (2011) Evolution of photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **62**, 515–548.

**Nelson, N.** (2011) Photosystems and global effects of oxygenic photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1807**, 856–863.

Uma revisão de nível intermediário sobre as forças evolutivas que moldaram a fotossíntese oxigênica.

## Problemas

**1. Reações de oxidação-redução.** O complexo da NADH-desidrogenase da cadeia respiratória mitocondrial promove a seguinte série de reações de oxidação-redução, nas quais $Fe^{3+}$ e $Fe^{2+}$ representam os centros de ferro-enxofre, Q é ubiquinona, $QH_2$ é ubiquinol e E é a enzima:

(1) $NADH + H^+ + E\text{-}FMN \longrightarrow NAD^+ + E\text{-}FMNH_2$
(2) $E\text{-}FMNH_2 + 2Fe^{3+} \longrightarrow E\text{-}FMN + 2Fe^{2+} + 2H^+$
(3) $2Fe^{2+} + 2H^+ + Q \longrightarrow 2Fe^{3+} + QH_2$

*Soma*: $NADH + H^+ + Q \longrightarrow NAD^+ + QH_2$

Para cada uma das três reações catalisadas pelo complexo da NADH-desidrogenase, identifique (a) o doador de elétrons, (b) o aceptor de elétrons, (c) o par redox conjugado, (d) o agente redutor e (e) o agente oxidante.

**2. Todas as partes da ubiquinona têm uma função.** Na transferência de elétrons, apenas a porção quinona da ubiquinona sofre oxidação-redução; a cadeia lateral isoprenoide permanece inalterada. Qual a função desta cadeia?

**3. Uso do FAD em vez do $NAD^+$ na oxidação do succinato.** Todas as desidrogenases da glicólise e do ciclo do ácido cítrico usam $NAD^+$ ($E'°$ para $NAD^+$/NADH é −0,32 V) como aceptor de elétrons, exceto pela succinato-desidrogenase, que usa FAD covalentemente ligado ($E'°$ para FAD/$FADH_2$ nessa enzima é 0,050 V). Sugira por que o FAD é um aceptor de elétrons mais apropriado do que o $NAD^+$ na desidrogenação do succinato, com base nos valores de $E'°$ para fumarato/succinato ($E'°$ = 0,031 V), $NAD^+$/NADH, e succinato-desidrogenase FAD/$FADH_2$.

**4. Grau de redução dos carregadores de elétrons na cadeia respiratória.** O grau de redução de cada carregador na cadeia respiratória é determinado pelas condições na mitocôndria. Por exemplo, quando NADH e $O_2$ são abundantes, o grau de redução em estado estacionário dos carregadores

decresce à medida que os elétrons passam do substrato ao $O_2$. Quando a transferência de elétrons é bloqueada, os carregadores antes do bloqueio se tornam mais reduzidos e aqueles além do bloqueio se tornam mais oxidados (ver Figura 19-6). Para cada uma das condições abaixo, preveja o estado de oxidação da ubiquinona e dos citocromos $b$, $c_1$, $c$ e $a + a_3$.

(a) NADH e $O_2$ abundantes, mas cianeto adicionado.
(b) NADH abundante, mas $O_2$ exaurido.
(c) $O_2$ abundante, mas NADH exaurido.
(d) NADH e $O_2$ abundantes.

**5. Efeito da rotenona e da antimicina A na transferência de elétrons.** Rotenona, produto tóxico natural de plantas, inibe fortemente a NADH-desidrogenase em mitocôndrias de insetos e peixes. Antimicina A, um antibiótico tóxico, inibe fortemente a oxidação do ubiquinol.

(a) Explique por que a ingestão de rotenona é letal para algumas espécies de insetos e peixes.

(b) Explique por que a antimicina A é um veneno.

(c) Considerando que a rotenona e a antimicina A são igualmente efetivas em bloquear seus respectivos sítios na cadeia de transferência de elétrons, qual delas seria um veneno mais potente? Explique.

**6. Desacopladores da fosforilação oxidativa.** Em mitocôndrias normais, a taxa de transferência de elétrons está fortemente acoplada à demanda por ATP. Quando a taxa de uso do ATP é relativamente baixa, a taxa de transferência de elétrons é baixa; quando a demanda por ATP aumenta, a taxa de transferência de elétrons aumenta. Sob essas condições de estreito acoplamento, o número de moléculas de ATP produzidas por átomo de oxigênio consumido quando o NADH é o doador de elétrons – a razão P/O – é de cerca de 2,5.

(a) Imagine o efeito de uma concentração relativamente baixa e de uma concentração relativamente alta de um agente desacoplador na taxa de transferência de elétrons e na razão P/O.

(b) A ingestão de desacopladores causa sudorese profusa e um aumento na temperatura corporal. Explique esse fenômeno em termos moleculares. O que acontece com a razão P/O na presença dos desacopladores?

(c) O desacoplador 2,4-dinitrofenol já foi prescrito como remédio de emagrecimento. Como esse agente poderia, a princípio, auxiliar na perda de peso? Agentes desacopladores não são mais prescritos, porque algumas mortes ocorreram após seu uso. Por que a ingestão de desacopladores pode levar à morte?

**7. Efeitos da valinomicina na fosforilação oxidativa.** Quando o antibiótico valinomicina é adicionado a mitocôndrias que respiram ativamente, vários eventos acontecem: o rendimento de ATP diminui, a taxa de consumo de $O_2$ aumenta, calor é liberado e o gradiente de pH através da membrana mitocondrial interna aumenta. A valinomicina age como um desacoplador ou como um inibidor da fosforilação oxidativa? Explique as observações experimentais em termos da capacidade do antibiótico de transferir íons $K^+$ através da membrana mitocondrial interna.

**8. Modo de ação da dicicloexilcarbodi-imida (DCCD).** Quando DCCD é adicionada à suspensão de mitocôndrias firmemente acopladas e respirando ativamente, a velocidade de transferência de elétrons (medida pelo consumo de $O_2$) e de produção de ATP diminui drasticamente. Se uma solução de 2,4-dinitrofenol é agora adicionada ao preparado, o consumo de $O_2$ retorna ao normal, mas a produção de ATP permanece inibida.

(a) Qual processo na transferência de elétrons ou na fosforilação oxidativa é afetado pela DCCD?

(b) Por que a DCCD afeta o consumo de $O_2$ nas mitocôndrias? Explique o efeito do 2,4-dinitrofenol no preparado mitocondrial inibido.

(c) Qual dos seguintes inibidores mais se assemelha à DCCD em sua ação: antimicina A, rotenona ou oligomicina?

**9. Compartimentalização dos componentes do ciclo do ácido cítrico.** A isocitrato-desidrogenase é encontrada apenas na mitocôndria, mas a malato-desidrogenase é encontrada tanto no citosol quanto na mitocôndria. Qual o papel da malato-desidrogenase citosólica?

**10. O sistema de transporte do malato-$\alpha$-cetoglutarato.** O sistema de transporte que conduz malato e $\alpha$-cetoglutarato através da membrana mitocondrial interna (ver Figura 19-31) é inibido por $n$-butilmalonato. Suponha que o $n$-butilmalonato seja adicionado a uma suspensão aeróbia de células renais usando exclusivamente glicose como combustível. Preveja o efeito desse inibidor em (a) glicólise, (b) consumo de oxigênio, (c) formação de lactato e (d) síntese de ATP.

**11. A concentração celular de ADP controla a formação de ATP.** Embora tanto ADP quanto $P_i$ sejam necessários para a síntese de ATP, a velocidade de síntese depende principalmente da concentração de ADP e não da de $P_i$. Por quê?

**12. Escalas de tempo dos eventos regulatórios em mitocôndrias.** Compare as prováveis escalas de tempo para os ajustes na velocidade da respiração causados por (a) aumento na [ADP] e (b) redução em $pO_2$. O que explica essa diferença?

**13. O efeito Pasteur.** Quando $O_2$ é adicionado a uma suspensão anaeróbia de células consumindo glicose em alta velocidade, essa velocidade diminui marcantemente à medida que o $O_2$ é consumido e o acúmulo de lactato cessa. Esse efeito, primeiramente observado por Louis Pasteur na década de 1860, é característico da maioria das células capazes tanto de catabolismo aeróbio quanto anaeróbio da glicose.

(a) Por que o acúmulo de lactato cessa depois que o $O_2$ é adicionado?

(b) Por que a presença de $O_2$ diminui a taxa de consumo de glicose?

(c) De que forma o início do consumo de $O_2$ reduz a taxa de consumo de glicose? Explique em termos de enzimas específicas.

**14. Mutantes de leveduras com deficiências na respiração e a produção de etanol.** Mutantes de leveduras com deficiências na respiração ($p^-$; "petites") podem ser produzidos a partir de pais do tipo selvagem por um tratamento com agentes mutagênicos. Os mutantes carecem de citocromo-oxidase, déficit que afeta marcantemente seu comportamento metabólico. Um efeito notável é que a fermentação não é suprimida por $O_2$ – ou seja, os mutantes não apresentam o efeito Pasteur (ver Problema 13). Algumas empresas estão muito interessadas em usar esses mutantes para fermentar cavacos de madeira até etanol para uso energético. Explique a vantagem de usar esses mutantes em vez de leveduras do tipo selvagem para produção de etanol em larga escala. Por que a ausência da citocromo-oxidase elimina o efeito Pasteur?

**15. Vantagens dos supercomplexos para a transferência de elétrons.** Existe evidência crescente de que os complexos mitocondriais I, II, III e IV sejam parte de um supercom-

plexo maior. Qual poderia se a vantagem de ter todos os quatro complexos em um supercomplexo?

**16. Quantos prótons em uma mitocôndria?** A transferência de elétrons transloca prótons da matriz mitocondrial para o meio externo,* estabelecendo um gradiente de pH através da membrana interna (o lado de fora mais ácido do que o de dentro). A tendência dos prótons de se difundirem de volta à matriz é a força propulsora para a síntese de ATP pela ATP-sintase. Em uma suspensão de mitocôndrias em um meio de pH 7,4, o pH da matriz foi avaliado em 7,7 durante a fosforilação oxidativa.

(a) Calcule $[H^+]$ no meio externo e na matriz nessas condições.

(b) Qual a razão da $[H^+]$ entre o lado de fora e o lado de dentro? Comente sobre a energia inerente a essa diferença de concentração. (Dica: ver Equação 11-4; p. 410.)

(c) Calcule o número de prótons em uma mitocôndria hepática respirando ativamente, presumindo que seu compartimento matricial é uma esfera de 1,5 $\mu$m de diâmetro.

(d) A partir desses dados, o gradiente de pH sozinho é suficiente para gerar ATP?

(e) Se não é, sugira de que forma surge a energia necessária para a síntese de ATP.

**17. Taxa de renovação do ATP em músculo cardíaco de ratos.** O músculo cardíaco de ratos operando aerobicamente obtém mais de 90% das suas necessidades de ATP via fosforilação oxidativa. Cada grama de tecido consome $O_2$ na velocidade de 10 $\mu$mol/min, com glicose como fonte de combustível.

(a) Calcule a velocidade de consumo de glicose e produção de ATP pelo músculo cardíaco.

(b) Para uma concentração de ATP em equilíbrio estacionário de 5 $\mu$mol/g de tecido muscular cardíaco, calcule o tempo necessário (em segundos) para repor completamente o conjunto (*pool*) celular de ATP. O que esse resultado indica sobre a necessidade de estreita regulação da produção de ATP? (Nota: as concentrações são expressas como micromols por grama de tecido muscular porque o tecido é principalmente água.)

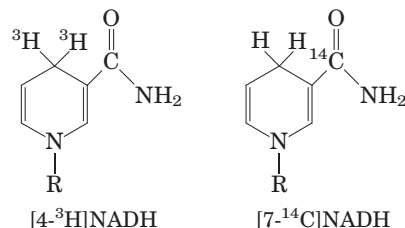
**18. A taxa de quebra de ATP em músculo de voo de insetos.** A produção de ATP no músculo de voo da mosca *Lucilia sericata* resulta quase que exclusivamente da fosforilação oxidativa. Durante o voo, 187 mL de $O_2$/h·g de peso corporal são necessários para manter a concentração de ATP de 7,0 $\mu$mol/g de músculo. Considerando que o músculo de voo compreende 20% do peso da mosca, calcule a taxa de reposição do conjunto de ATP no músculo de voo. Quanto tempo duraria o reservatório de ATP na ausência da fosforilação oxidativa? Considere para o cálculo que os equivalentes redutores são transferidos pela lançadeira do glicerol-3-fosfato e que o $O_2$ está a 25°C e a 101,3 kPa (1 atm).

**19. Doença mitocondrial e câncer.** Mutações nos genes que codificam certas proteínas mitocondriais estão associadas à alta incidência de certos tipos de câncer. De que forma mitocôndrias com defeitos podem levar ao câncer?

**20. Gravidade variável de uma doença mitocondrial.** Pessoas com uma doença causada por um defeito específico no genoma mitocondrial podem ter sintomas que variam de moderados a graves. Explique por quê.

* N. de T. O meio externo a que o problema se refere seria o espaço intermembranas.

**21. Movimento transmembrana de equivalentes redutores.** Sob condições aeróbias, o NADH extramitocondrial precisa ser oxidado pela cadeia mitocondrial de transferência de elétrons. Considere um preparado de hepatócitos de ratos contendo mitocôndrias e todas as enzimas citosólicas. Se $[4\text{-}^3H]$NADH é introduzido, radioatividade logo aparece na matriz mitocondrial. No entanto, se $[7\text{-}^{14}C]$NADH é introduzido, nenhuma radioatividade aparece na matriz. O que essas observações revelam sobre a oxidação do NADH extramitocondrial pela cadeia de transferência de elétrons?

$[4\text{-}^3H]$NADH $[7\text{-}^{14}C]$NADH

**22. Altos níveis de alanina no sangue associados a defeitos na fosforilação oxidativa.** Em sua maioria, as pessoas com defeitos genéticos na fosforilação oxidativa têm concentrações relativamente altas de alanina no sangue. Explique isso em termos bioquímicos.

**23. Conjuntos (*pools*) de $NAD^+$ e atividades de desidrogenases.** Embora tanto a piruvato-desidrogenase quanto a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase usem $NAD^+$ como aceptor eletrônico, as duas enzimas não competem pelo mesmo conjunto de NAD celular. Por quê?

**24. O diabetes como consequência de defeitos mitocondriais.** A glicocinase é essencial para o metabolismo da glicose em células $\beta$ pancreáticas. Os humanos com duas cópias defeituosas do gene da glicocinase exibem diabetes neonatal grave, enquanto aqueles com apenas uma cópia defeituosa do gene têm uma forma bem mais moderada da doença (diabetes juvenil com início na maturidade, MODY2, de *mature onset diabetes of the young*). Explique essa diferença em termos da biologia das células $\beta$.

**25. Efeitos das mutações no complexo II mitocondrial.** Mudanças em um único nucleotídeo no gene da succinato-desidrogenase (complexo II) estão associadas a tumores carcinoides do intestino médio. Sugira um mecanismo para explicar essa observação.

**26. Eficiência fotoquímica da luz em diferentes comprimentos de onda.** A velocidade da fotossíntese, medida pela produção de $O_2$, é maior quando uma planta verde é iluminada com luz de comprimento de onda de 680 nm do que com luz de 700 nm. No entanto, a combinação de luz de 680 e 700 nm gera uma taxa de fotossíntese maior do que a luz de cada um dos comprimentos de onda isoladamente. Explique.

**27. Planilha de balanço da fotossíntese.** Em 1804, Theodore de Saussure observou que o peso total (de oxigênio e de matéria orgânica seca) produzido pelas plantas é maior do que o peso de dióxido de carbono consumido durante a fotossíntese. De onde vem esse peso extra?

**28. O papel do $H_2S$ em algumas bactérias fotossintéticas.** Bactérias púrpuras sulfurosas,** quando iluminadas, realizam a fotossíntese na presença de $H_2O$ e de $^{14}CO_2$, mas

** N. de T. Certamente os autores se referem às bactérias verdes sulfurosas.

apenas se $H_2S$ é adicionado e $O_2$ é removido. Durante o curso da fotossíntese, medida pela formação de [$^{14}$C]carboidrato, $H_2S$ é convertido em enxofre elementar, mas nenhum $O_2$ é produzido. Qual o papel da conversão de $H_2S$ em enxofre? Por que nenhum $O_2$ é produzido?

**29. O aumento do poder redutor do fotossistema I pela absorção de luz.** Quando o fotossistema I absorve luz vermelha a 700 nm, o potencial de redução padrão do P700 muda de 0,40 V para cerca de −1,2 V. Que fração da luz absorvida é aprisionada na forma de força redutora?

**30. Fluxo de elétrons pelos fotossistemas I e II.** Preveja como um inibidor da passagem de elétrons pela feofitina afetaria o fluxo de elétrons pelo (a) do fotossistema II e (b) do fotossistema I. Explique o seu raciocínio.

**31. Síntese limitada de ATP no escuro.** Em um experimento de laboratório, cloroplastos de espinafre são iluminados na ausência de ADP e $P_i$; a luz é então desligada e ADP e $P_i$ são adicionados. ATP é sintetizado por um curto período de tempo no escuro. Explique esse achado.

**32. Modo de ação do herbicida DCMU.** Quando cloroplastos são tratados com 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilureia (DCMU ou diuron), um herbicida potente, a liberação de $O_2$ e a fotofosforilação cessam. A liberação de $O_2$, mas não a fotofosforilação, pode ser restaurada pela adição de um aceptor externo de elétrons, ou reagente de Hill. De que forma o DCMU age como exterminador de plantas daninhas? Sugira uma localização para a ação inibitória desse herbicida no esquema mostrado na Figura 19-58. Explique.

**33. Efeito da venturicidina na liberação de oxigênio.** A venturicidina é um inibidor poderoso da ATP-sintase do cloroplasto, interagindo com a porção $CF_o$ da enzima e bloqueando a passagem de prótons pelo complexo $CF_oCF_1$. Como a venturicidina afetaria a liberação de oxigênio em uma suspensão de cloroplastos bem iluminados? A sua resposta mudaria se o experimento fosse feito na presença de um reagente desacoplador, como o 2,4-dinitrofenol (DNP)? Explique.

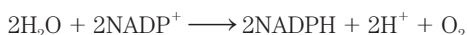
**34. Bioenergética da fotofosforilação.** As concentrações de equilíbrio estacionário de ATP, ADP e $P_i$ em cloroplastos isolados de espinafre sob iluminação plena a pH 7 são 120, 6 e 700 $\mu$M, respectivamente.

(a) Qual a energia livre necessária para a síntese de 1 mol de ATP nestas condições?

(b) A energia para a síntese de ATP é fornecida pela transferência de elétrons induzida pela luz nos cloroplastos. Qual a variação mínima de voltagem necessária (durante a transferência de um par de elétrons) para sintetizar ATP nessas condições? (Talvez você precise consultar a Equação 13-7, p. 531.)

**35. Energia luminosa para uma reação redox.** Suponha que você tenha isolado um novo microrganismo fotossintético que oxida $H_2S$ e passa os elétrons ao $NAD^+$. Luz de qual comprimento de onda forneceria energia suficiente para o $H_2S$ reduzir o $NAD^+$ sob condições padrão? Assuma 100% de eficiência no evento fotoquímico e use $E'°$ de −243 mV para o $H_2S$ e −320 mV para o $NAD^+$. Ver Figura 19-48 para os equivalentes de energia da luz de diferentes comprimentos de onda.

**36. Constante de equilíbrio para as reações de quebra da água.** A coenzima $NADP^+$ é o aceptor final de elétrons nos cloroplastos, de acordo com a reação

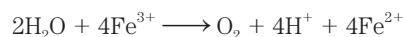
$$2H_2O + 2NADP^+ \longrightarrow 2NADPH + 2H^+ + O_2$$

Use a informação na Tabela 19-2 para calcular a constante de equilíbrio para esta reação a 25°C. (A relação entre $K'_{eq}$ e $\Delta G'°$ é discutida na p. 508.) De que forma o cloroplasto pode superar esse equilíbrio desfavorável?

**37. Energética da fototransdução.** Durante a fotossíntese, oito fótons precisam ser absorvidos (quatro em cada fotossistema) para cada molécula de $O_2$ produzida:

$$2H_2O + 2NADP^+ + 8 \text{ fótons} \longrightarrow 2NADPH + 2H^+ + O_2$$

Assumindo que esses fótons tenham um comprimento de onda de 700 nm (vermelho) e que a absorção de luz e o uso da energia luminosa são 100% eficientes, calcule a variação de energia livre para o processo.

**38. Transferência de elétrons para um reagente de Hill.** Cloroplastos isolados de espinafre liberam $O_2$ quando iluminados na presença de ferricianeto de potássio (um reagente de Hill), de acordo com a equação

$$2H_2O + 4Fe^{3+} \longrightarrow O_2 + 4H^+ + 4Fe^{2+}$$

onde $Fe^{3+}$ representa ferricianeto e $Fe^{2+}$, ferrocianeto. NADPH é produzido neste processo? Explique.

**39. Com que frequência uma molécula de clorofila absorve um fóton?** A quantidade de clorofila *a* ($M_r$ 892) em uma folha de espinafre é de cerca de 20 $\mu$g/cm$^2$ de superfície foliar. Sob luz solar de meio-dia (quando a energia média atingindo a folha é de 5,4 J/cm$^2$ · min), a folha absorve cerca de 50% da radiação. Com que frequência uma única molécula de clorofila absorve um fóton? Considerando que o tempo de vida médio de uma molécula excitada de clorofila *in vivo* é 1 ns, que fração das moléculas de clorofila é excitada em um momento qualquer?

**40. Efeito da luz monocromática no fluxo de elétrons.** A extensão na qual um carregador de elétrons é oxidado ou reduzido durante a transferência fotossintética de elétrons algumas vezes pode ser observada diretamente com um espectrofotômetro. Quando os cloroplastos são iluminados com luz de 700 nm, citocromo *f*, plastocianina e plastoquinona são oxidados. No entanto, quando os cloroplastos são iluminados com luz de 680 nm, esses carregadores de elétrons são reduzidos. Explique.

**41. Função da fotofosforilação cíclica.** Quando a razão [NADPH]/[$NADP^+$] nos cloroplastos é alta, a fotofosforilação é predominantemente cíclica (ver Figura 19-58). $O_2$ é liberado durante a fotofosforilação cíclica? NADPH é produzido? Explique. Qual a principal função da fotofosforilação cíclica?

## Problema de análise de dados

**42. Fotofosforilação: descoberta, rejeição e redescoberta.** Nos anos de 1930 e 1940, pesquisadores estavam começando a progredir na direção da compreensão do mecanismo da fotossíntese. Naquela época, o papel das "ligações fosfato ricas em energia" (hoje, "ATP") na glicólise e na respiração celular estava apenas começando a ser conhecido. Havia muitas teorias sobre o mecanismo da fotossíntese, especialmente sobre o papel da luz. Este problema focaliza aquilo que era então chamado de "processo fotoquímico primário" – ou seja, o que exatamente a energia da luz capturada produz na célula fotossintética. É interessante que uma parte importante do modelo moderno da fotossíntese foi proposta cedo, apenas para ser rejeitada, ignorada por vários anos e então finalmente reavivada e aceita.

Em 1944, Emerson, Stauffer e Umbreit propuseram que "a função da energia luminosa na fotossíntese é a formação de ligações fosfato ricas em energia" (p. 107). No modelo deles (de agora em diante, "modelo de Emerson"), a energia livre necessária para impulsionar a fixação *e* a redução do $CO_2$ vinha dessas "ligações fosfato ricas em energia" (i.e., ATP), produzidas como resultado da absorção de luz por uma proteína contendo clorofila.

Esse modelo foi explicitamente rejeitado por Rabinowitch (1945). Depois de resumir os achados de Emerson e colaboradores, Rabinowitch afirmou: "até que evidências mais positivas sejam fornecidas, estamos inclinados a considerar como mais convincente um argumento geral contra esta hipótese, que pode ser derivado de considerações energéticas. A fotossíntese é eminentemente um problema de *acúmulo* de energia. Que bem pode fazer, então, converter quanta de luz (mesmo aqueles da luz vermelha, que chegam a cerca de 43 kcal por einstein) em 'quanta de fosfato' de apenas 10 kcal por mol? Isso parece ser uma largada na direção errada – em direção à *dissipação* em vez de em direção ao acúmulo de energia" (Vol. I, p. 228). Esse argumento, junto com outras evidências, levou ao abandono do modelo de Emerson até a década de 1950, quando se viu que era correto – embora em uma forma modificada.

Para cada informação do artigo de Emerson e colaboradores apresentada de (a) a (d), responda as três questões que seguem:

1. Como é que essas informações sustentam o modelo de Emerson, no qual a energia da luz é usada diretamente pela clorofila para *fazer* ATP, e o ATP então fornece a energia para promover a fixação e a redução do $CO_2$?
2. Como Rabinowitch explicaria essas informações, com base em seu modelo (e na maioria dos outros modelos da época), no qual a energia da luz é usada diretamente pela clorofila para *produzir compostos redutores*? Rabinowitch escreveu: "teoricamente, não existe razão por que *toda* a energia eletrônica contida em moléculas excitadas pela absorção de luz não deveria estar disponível para oxidação-redução" (Vol. I, p. 152). Nesse modelo, os compostos reduzidos são então usados para fixar e reduzir $CO_2$, e a energia para essas reações vem das grandes quantidades de energia livre liberada pelas reações de redução.
3. De que forma essas informações são explicadas pelo entendimento moderno da fotossíntese?

(a) A clorofila contém um íon $Mg^{2+}$, conhecido por ser um cofator essencial para muitas enzimas que catalisam reações de fosforilação e desfosforilação.

(b) Uma "proteína clorofila" bruta isolada de células fotossintéticas mostrou atividade fosforilante.

(c) A atividade fosforilante da "proteína clorofila" foi inibida pela luz.

(d) Os níveis de diferentes compostos fosforilados em células fotossintéticas mudaram dramaticamente em resposta à exposição à luz (Emerson e colaboradores não foram capazes de identificar os compostos específicos envolvidos).

No final das contas, os modelos de Emerson e Rabinowitch estavam ambos parcialmente corretos e parcialmente incorretos.

(e) Explique como os dois modelos se relacionam ao modelo atual da fotossíntese.

Em sua rejeição do modelo de Emerson, Rabinowitch foi além e disse: "a dificuldade da teoria do armazenamento de fosfato aparece mais claramente quando se considera o fato de que, sob luz fraca, oito ou dez quanta de luz são suficientes para reduzir uma molécula de dióxido de carbono. Se cada quantum fosse produzir uma molécula de fosfato de alta energia, a energia acumulada seria de apenas 80 a 100 kcal por einstein – enquanto a fotossíntese requer *pelo menos* 112 kcal por mol e provavelmente mais, por causa das perdas em reações parciais irreversíveis" (Vol. I, p. 228).

(f) De que forma o valor de Rabinowitch de 8 a 10 fótons por molécula reduzida de $CO_2$ se compara com o valor hoje aceito? Você precisa consultar o Capítulo 20 para algumas das informações aqui requeridas.

(g) Como você rebateria o argumento de Rabinowitch, com base no conhecimento atual sobre a fotossíntese?

## Referências

**Emerson, R.L., Stauffer, J.F., & Umbreit, W.W.** (1944) Relationships between phosphorylation and photosynthesis in *Chlorella. Am. J. Botany* **31**, 107–120.

**Rabinowitch, E.I.** (1945) *Photosynthesis and Related Processes*, Interscience Publishers, New York.

# 20

# Biossíntese de Carboidratos em Plantas e Bactérias



Este capítulo marca um ponto decisivo no estudo do metabolismo celular. Até agora, na Parte II, foi descrito de que modo os principais combustíveis metabólicos – carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos – são degradados por vias *catabólicas* convergentes para ingressarem no ciclo do ácido cítrico e entregarem seus elétrons à cadeia respiratória, e de que forma esse fluxo exergônico de elétrons ao oxigênio está acoplado à síntese endergônica de ATP. Agora o foco é direcionado às vias *anabólicas*, que usam energia química na forma de ATP e NADH ou NADPH para sintetizar componentes celulares a partir de moléculas precursoras simples. As vias anabólicas geralmente são redutoras em vez de oxidativas. O catabolismo e o anabolismo ocorrem simultaneamente em um estado estacionário dinâmico, de forma que a degradação geradora de energia de componentes celulares é contrabalançada por processos biossintéticos, os quais criam e mantêm a intrincada organização das células vivas.

As plantas precisam ser especialmente versáteis na maneira como lidam com os carboidratos, por várias razões. Primeiro, as plantas são autótrofos, capazes de converter carbono inorgânico (como $CO_2$) em compostos orgânicos. Segundo, a biossíntese ocorre principalmente em plastídeos, organelas delimitadas por membranas, exclusivas dos organismos fotossintéticos, e o movimento de intermediários entre compartimentos celulares é um importante aspecto do metabolismo. Terceiro, as plantas não são móveis: elas não podem se mover para encontrar melhores suprimentos de água, luz solar e nutrientes. Elas precisam ter flexibilidade metabólica o suficiente para que possam adaptar-se a condições mutáveis no local onde estão enraizadas. Finalmente, as plantas têm paredes celulares grossas, feitas de polímeros de carboidratos, que precisam ser montados do lado de fora da membrana plasmática e que constituem uma proporção significativa dos carboidratos celulares.

Este capítulo começa com uma descrição do processo pelo qual o $CO_2$ é assimilado em trioses e hexoses; a seguir, aborda a fotorrespiração, importante reação colateral durante a fixação do $CO_2$, e as maneiras pelas quais certas plantas evitam essa reação colateral. Depois analisa como a biossíntese de sacarose (para transporte de açúcar) e de amido (para estocagem de energia) é realizada por mecanismos análogos àqueles utilizados por células animais para sintetizar glicogênio. O tópico seguinte é a síntese da celulose das paredes celulares vegetais e do peptideoglicano das paredes celulares bacterianas, ilustrando os problemas da biossíntese dependente de energia fora da membrana plasmática. Finalmente, são discutidas as diversas vias que compartilham conjuntos de intermediários comuns e de que maneira são segregadas dentro das organelas, mas, ainda assim, permanecem integradas umas às outras.

## 20.1 Síntese fotossintética de carboidratos

A síntese de carboidratos em células animais utiliza precursores contendo sempre pelo menos três carbonos, todos eles menos oxidados do que o carbono no $CO_2$. Em contrapartida, plantas e microrganismos fotossintéticos podem sintetizar carboidratos a partir de $CO_2$ e água, reduzindo o $CO_2$ às custas da energia e do poder redutor fornecidos pelo ATP e pelo NADPH gerados pelas reações dependentes de luz da fotossíntese (**Figura 20-1**). As plantas (e outros autótrofos) podem usar $CO_2$ como a única fonte dos átomos de carbono necessários para a biossíntese de celulose e de amido, de lipídeos e de proteínas e de muitos outros componentes orgânicos nas células vegetais. Por outro lado, os heterótrofos não podem realizar a redução líquida do $CO_2$ para a síntese líquida de glicose.

As plantas verdes contêm em seus cloroplastos uma maquinaria enzimática singular, que catalisa a conversão de $CO_2$ em compostos orgânicos simples (reduzidos), um processo denominado **assimilação de $CO_2$**. Esse processo também foi chamado de **fixação de $CO_2$** ou **fixação de carbono**, mas esses termos são reservados para a reação específica na qual o $CO_2$ é incorporado (fixado) em um composto orgânico de três carbonos, a triose-fosfato-3-fosfogli-

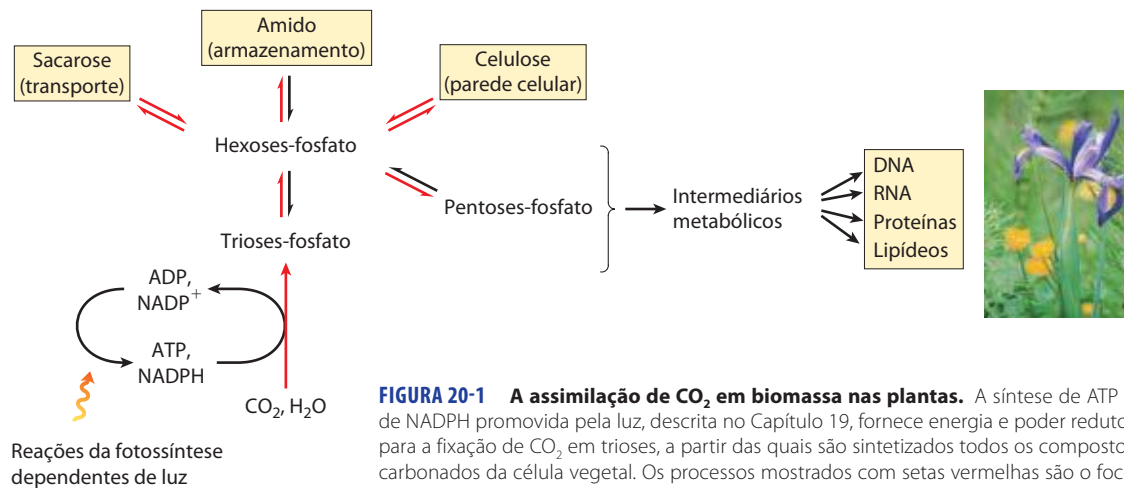



**FIGURA 20-1 A assimilação de $CO_2$ em biomassa nas plantas.** A síntese de ATP e de NADPH promovida pela luz, descrita no Capítulo 19, fornece energia e poder redutor para a fixação de $CO_2$ em trioses, a partir das quais são sintetizados todos os compostos carbonados da célula vegetal. Os processos mostrados com setas vermelhas são o foco deste capítulo.

Melvin Calvin, 1911-1997

cerato. Esse produto simples da fotossíntese é o precursor de biomoléculas mais complexas, incluindo açúcares, polissacarídeos e os metabólitos derivados deles, todos sintetizados por vias metabólicas semelhantes àquelas dos tecidos animais. O dióxido de carbono é assimilado por uma via cíclica, seus intermediários-chave são constantemente regenerados. Essa via foi elucidada no início da década de 1950 por Melvin Calvin, Andrew Benson e James A. Bassham e é comumente chamada de **ciclo de Calvin** ou, de forma mais descritiva, **ciclo de redução fotossintética do carbono**.

O metabolismo de carboidratos é mais complexo em células vegetais do que em células animais ou em microrganismos não fotossintéticos. Além das vias universais da glicólise e da gliconeogênese, as plantas apresentam as sequências de reações únicas para a redução do $CO_2$ a trioses-fosfato e a via redutora associada da pentose-fosfato – e todas essas vias precisam ser coordenadamente reguladas para assegurar a alocação adequada de carbono para a produção de energia e a síntese de amido e sacarose. Enzimas-chave são reguladas, como será visto, por (1) redução de ligações dissulfeto por elétrons que fluem do fotossistema I e por (2) mudanças no pH e na concentração de $Mg^{2+}$, que resultam da iluminação. Ao analisar outros aspectos do metabolismo dos carboidratos em plantas, também encontram-se enzimas moduladas por (3) regulação alostérica convencional por um ou mais metabólitos intermediários e (4) modificação covalente (fosforilação).

## Os plastídeos são organelas exclusivas das células vegetais e das algas

A maioria das atividades biossintéticas em plantas (incluindo a assimilação de $CO_2$) ocorre em **plastídeos**, família de organelas que se autorreproduzem, sendo delimitadas por uma membrana dupla e contendo um pequeno genoma que codifica algumas de suas proteínas. A maioria das proteínas destinadas aos plastídeos é codificada em genes nucleares, os quais são transcritos e traduzidos como outros genes nucleares; as proteínas são então transportadas para os plastídeos. Os plastídeos se reproduzem por fissão binária, replicando seus genomas (molécula única de DNA circular) e usando suas próprias enzimas e ribossomos para sintetizar as proteínas codificadas pelo genoma. Os **cloroplastos** (ver Figura 19-47) são os sítios da assimilação de $CO_2$. As enzimas para esse processo estão contidas no estroma, a fase solúvel, circundado pela membrana interna do cloroplasto. Os **amiloplastos** são plastídeos incolores (ou seja, carecem de clorofila e de outros pigmentos encontrados nos cloroplastos). Suas membranas internas não são análogas às membranas fotossintéticas (tilacoides) dos cloroplastos e, em tecidos vegetais ricos em amido, esses plastídeos estão repletos de grânulos de amido (**Figura 20-2**). Os cloroplastos podem ser convertidos em **proplastídeos** pela perda de suas membranas internas e da clorofila, e os proplastídeos são interconversíveis com os amiloplastos

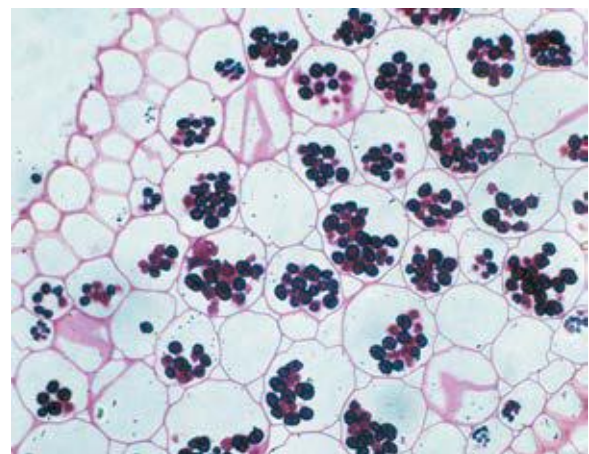



**FIGURA 20-2 Amiloplastos ricos em amido (grânulos escuros) são corados com iodo nesta secção de células de raiz de *Ranunculus*.** Os grânulos de amido em vários tecidos variam de 1 a 100 μm de diâmetro.

(**Figura 20-3**). Por sua vez, tanto amiloplastos quanto proplastídeos podem se desenvolver em cloroplastos. A abundância relativa dos tipos de plastídeos depende do tipo de tecido vegetal e da intensidade de iluminação. As células de folhas verdes são ricas em cloroplastos, enquanto os amiloplastos dominam os tecidos não fotossintéticos que armazenam grandes quantidades de amido, como os tubérculos de batata.

As membranas internas de todos os tipos de plastídeos são impermeáveis a moléculas polares e carregadas. O trânsito através dessas membranas é mediado por conjuntos de transportadores específicos.

**FIGURA 20-3 Plastídeos: suas origens e interconversões.** Todos os tipos de plastídeos são delimitados por uma membrana dupla, e alguns (em especial os cloroplastos maduros) têm extensas membranas internas. As membranas internas podem ser perdidas (quando um cloroplasto maduro se torna um proplastídeo) e ressintetizadas (quando um proplastídeo dá origem a um plastídeo pré-granal e, então, a um cloroplasto maduro). Os proplastídeos em tecidos não fotossintéticos (como raízes) dão origem a amiloplastos, que contêm grandes quantidades de amido. Todas as células vegetais têm plastídeos e estas organelas são o sítio não apenas da fotossíntese, mas de outros processos, incluindo a síntese de aminoácidos essenciais, de tiamina, de piridoxal-fosfato, de flavinas e de vitaminas A, C, E e K.

## A assimilação de dióxido de carbono ocorre em três estágios

O primeiro estágio na assimilação do $CO_2$ em biomoléculas (**Figura 20-4**) é a **reação de fixação de carbono**: a condensação de $CO_2$ com um aceptor de cinco carbonos, a **ribulose-1,5-bifosfato**, para formar duas moléculas de **3-fosfoglicerato**. No segundo estágio, o 3-fosfoglicerato é reduzido a trioses-fosfato. Ao todo, três moléculas de $CO_2$ são fixadas a três moléculas de ribulose-1,5-bifosfato, para formar seis moléculas de gliceraldeído-3-fosfato (18 carbonos) em equilíbrio com a di-hidroxiacetona-fosfato. No terceiro estágio, cinco das seis moléculas de triose-fosfato (15 carbonos) são usadas para regenerar três moléculas de ribulose-1,5-bifosfato (15 carbonos), o material de partida. A sexta molécula de triose-fosfato, o produto líquido da fotossíntese, pode ser usada para produzir hexoses para combustível e blocos construtivos, sacarose para transporte para tecidos não fotossintéticos ou amido para armazenamento. Assim, o processo global é cíclico, com a conversão contínua de $CO_2$ em triose e hexoses-fosfato. A frutose-6-fosfato é um intermediário-chave no estágio 3 da assimilação de $CO_2$; ela se situa em um ponto de ramificação, levando à regeneração da ribulose-1,5-bifosfato ou à síntese de amido.

A via da hexose-fosfato até a pentose-bifosfato envolve muitas das mesmas reações usadas em células animais para a conversão de pentoses-fosfato em hexoses-fosfato durante a fase não oxidativa da **via da pentose-fosfato** (ver Figura 14-23). Na assimilação fotossintética de $CO_2$, essencialmente o mesmo conjunto de reações opera na outra direção, convertendo hexoses-fosfato em pentoses-fosfato. Esse **ciclo redutor da pentose-fosfato** usa as mesmas enzimas que a via oxidativa e muitas outras enzimas que tornam o ciclo redutor irreversível. Todas as treze enzimas da via estão no estroma do cloroplasto.

**Estágio 1: Fixação de $CO_2$ em 3-fosfoglicerato** Uma pista importante a respeito da natureza dos mecanismos de assimilação de $CO_2$ em organismos fotossintéticos surgiu no final da década de 1940. Calvin e colaboradores iluminaram uma suspensão de algas verdes na presença de dióxido de carbono radioativo ($^{14}CO_2$) por

**FIGURA 20-4 Os três estágios da assimilação de $CO_2$ em organismos fotossintéticos.** As estequiometrias de três intermediários-chave (números entre parênteses) revelam o destino dos átomos de carbono que entram e saem do ciclo. Conforme mostrado aqui, três $CO_2$ são fixados para a síntese líquida de uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato. Este é o ciclo de redução fotossintética do carbono ou ciclo de Calvin.

apenas poucos segundos e então rapidamente mataram as células, extraíram seus conteúdos e, com a ajuda de métodos cromatográficos, procuraram pelos metabólitos nos quais o carbono marcado aparecia primeiro. O primeiro composto que se tornou marcado foi o **3-fosfoglicerato**, com o $^{14}C$ localizado predominantemente no átomo de carbono da carboxila. Esses experimentos sugeriram que o 3-fosfoglicerato é um intermediário inicial na fotossíntese. As muitas plantas nas quais esse composto de três carbonos é o primeiro intermediário são chamadas de **plantas $C_3$**, ao contrário das plantas $C_4$, descritas a seguir.

A enzima que catalisa a incorporação do $CO_2$ em forma orgânica é a **ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase/oxigenase**, nome encurtado para **rubisco**. Como carboxilase, a rubisco catalisa a ligação covalente do $CO_2$ ao açúcar de 5 carbonos ribulose-1,5-bifosfato e a clivagem do intermediário instável de seis carbonos resultante, formando duas moléculas de 3-fosfoglicerato, uma das quais aloja o carbono introduzido como $CO_2$ em seu grupo carboxila (Figura 20-4). A atividade de oxigenase da enzima é discutida na Seção 20.2.

Existem duas formas distintas de rubisco. A forma I é encontrada em plantas vasculares, algas e cianobactérias; a forma II está confinada a certas bactérias fotossintéticas. A rubisco das plantas, a enzima crucial na produção de biomassa a partir do $CO_2$, tem uma estrutura complexa da forma I (**Figura 20-5a**), com oito subunidades grandes idênticas ($M_r$ 53.000; codificadas no genoma do cloroplasto ou plastoma), cada uma contendo um sítio catalítico e oito subunidades pequenas idênticas ($M_r$ 14.000; codificadas no genoma nuclear) de função incerta. A forma II da rubisco das bactérias fotossintéticas tem estrutura mais simples, tendo duas subunidades que, em muitos aspectos, lembram as subunidades grandes da enzima vegetal (Figura 20-5b). A similaridade é consistente com a hipótese endossimbiótica para a origem dos cloroplastos (p. 36). A enzima vegetal tem um número de renovação excepcionalmente baixo; apenas três moléculas de $CO_2$ são fixadas por segundo por molécula de rubisco a 25°C. Portanto, para atingir altas taxas de fixação de $CO_2$, as plantas precisam de grandes quantidades dessa enzima. De fato, a rubisco constitui quase 50% da proteína solúvel nos cloroplastos e provavelmente seja uma das enzimas mais abundantes na biosfera.

Uma cadeia lateral carbamoilada de Lys com um íon $Mg^{2+}$ ligado é de importância central para o mecanismo pro-

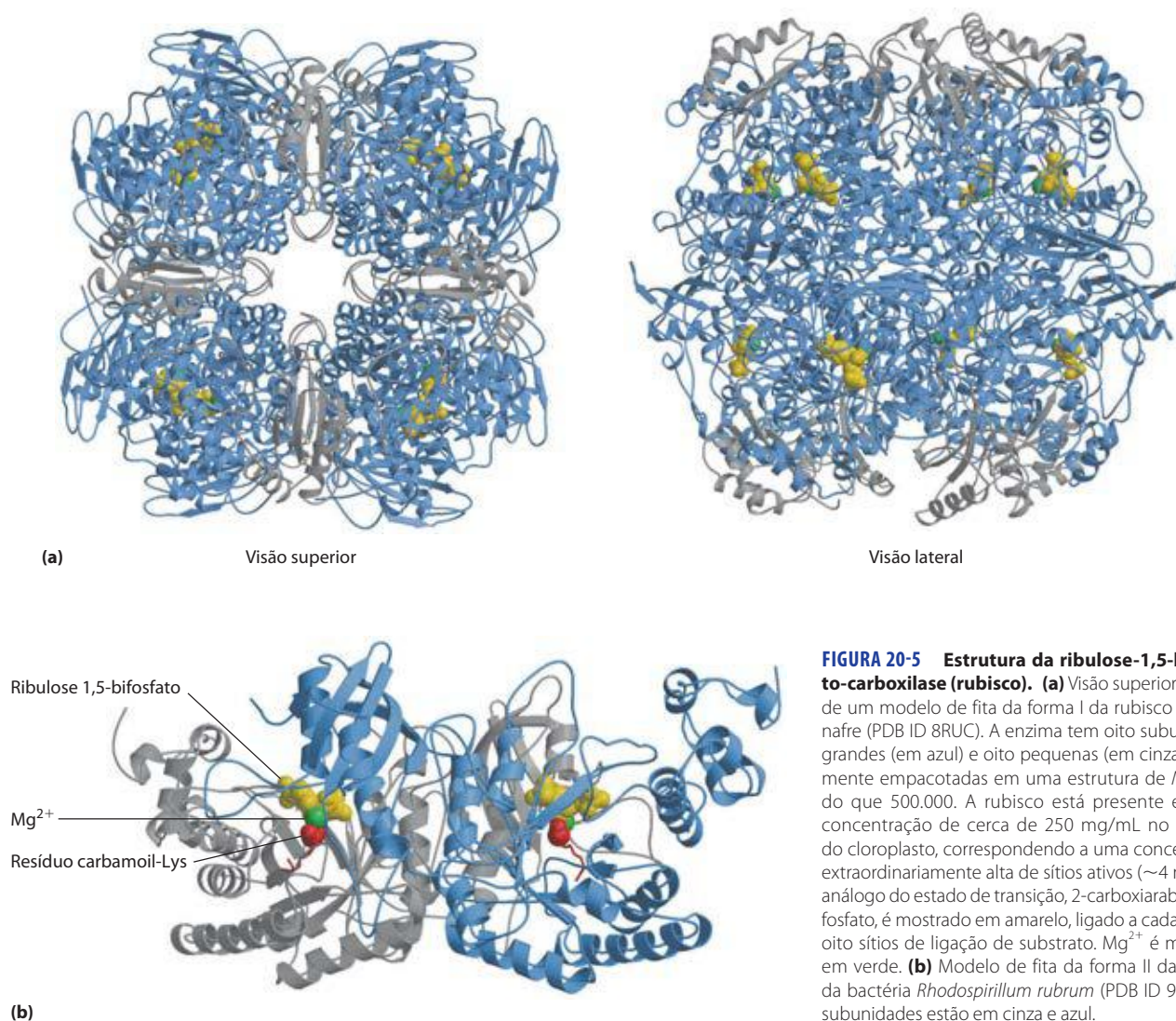



**FIGURA 20-5 Estrutura da ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase (rubisco). (a)** Visão superior e lateral de um modelo de fita da forma I da rubisco de espinafre (PDB ID 8RUC). A enzima tem oito subunidades grandes (em azul) e oito pequenas (em cinza), firmemente empacotadas em uma estrutura de $M_r$ maior do que 500.000. A rubisco está presente em uma concentração de cerca de 250 mg/mL no estroma do cloroplasto, correspondendo a uma concentração extraordinariamente alta de sítios ativos (~4 mM). Um análogo do estado de transição, 2-carboxiarabinitol bifosfato, é mostrado em amarelo, ligado a cada um dos oito sítios de ligação de substrato. $Mg^{2+}$ é mostrado em verde. **(b)** Modelo de fita da forma II da rubisco da bactéria *Rhodospirillum rubrum* (PDB ID 9RUB). As subunidades estão em cinza e azul.

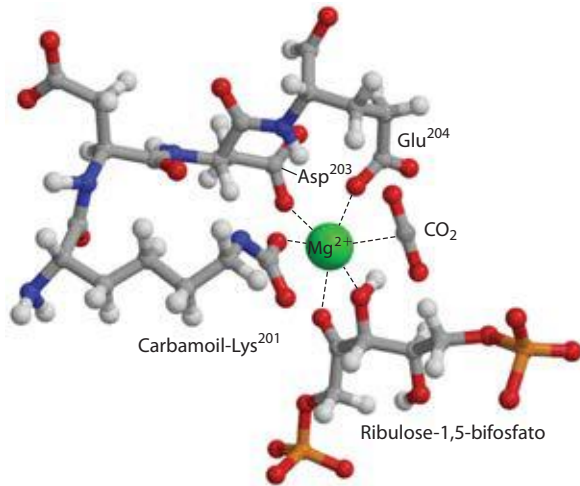



**FIGURA 20-6 Papel central do $Mg^{2+}$ no mecanismo catalítico da rubisco.** (Derivado de PDB ID 1RXO) $Mg^{2+}$ está coordenado em um complexo aproximadamente octaédrico com seis átomos de oxigênio: um oxigênio no carbamato na Lys[201]; dois nos grupos carboxila do Glu[204] e do Asp[203]; dois em C-2 e C-3 do substrato, ribulose-1,5-bifosfato; e um no outro substrato, $CO_2$. Uma molécula de água ocupa o sítio de ligação do $CO_2$ nesta estrutura cristalina. Nesta figura, uma molécula de $CO_2$ é modelada em seu lugar (os resíduos numerados se referem à enzima do espinafre).

posto para a rubisco vegetal. O íon $Mg^{2+}$ aproxima e orienta os reagentes no sítio ativo (**Figura 20-6**) e polariza o $CO_2$, abrindo-o para o ataque nucleofílico pelo intermediário da reação enediolato de cinco carbonos, formado na enzima (**Figura 20-7**). O intermediário de seis carbonos resultante se quebra para produzir duas moléculas de 3-fosfoglicerato.

Rubisco

Ribulose-1,5-bifosfato

Cadeia lateral de Lys carbamoilada

❶ A ribulose-1,5-bifosfato forma um enediolato no sítio ativo.

Intermediário enediolato

❷ $CO_2$ polarizado pela proximidade do íon $Mg^{2+}$ sofre um ataque nucleofílico pelo enediolato, gerando um açúcar ramificado de 6 carbonos.

Intermediário β-cetoácido

❸ A hidroxilação ocorre na carbonil em C-3.

Intermediário hidratado

❹ A clivagem produz uma molécula de 3-fosfoglicerato

3-Fosfoglicerato

❺ A protonação de carbânion gera uma segunda molécula de 3-fosfoglicerato.

3-Fosfoglicerato

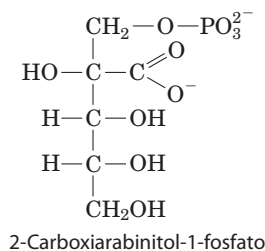
**MECANISMO-FIGURA 20-7 Primeiro estágio da assimilação de $CO_2$: atividade de carboxilase da rubisco.** A reação de fixação de $CO_2$ é catalisada pela ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase/oxigenase (rubisco). A reação global realiza a combinação de um $CO_2$ e uma ribulose-1,5-bifosfato para formar duas moléculas de 3-fosfoglicerato, uma das quais contém o átomo de carbono do $CO_2$ (em vermelho). Transferências adicionais de prótons (não mostradas), envolvendo Lys[201], Lys[175] e His[294] ocorrem em várias destas etapas.

**Mecanismo da rubisco; Tutorial da rubisco**

Como catalisadora do primeiro passo da assimilação fotossintética de $CO_2$, a rubisco é um alvo primário para regulação. A enzima permanece inativa até que seja carbamoilada no grupo $\varepsilon$-amino da $Lys^{201}$ (**Figura 20-8**). A ribulose-1,5-bifosfato inibe a carbamoilação, ligando-se firmemente ao sítio ativo e trancando a enzima na conformação "fechada", na qual $Lys^{201}$ é inacessível. A **rubisco-ativase** supera a inibição promovendo a liberação dependente de ATP da ribulose-1,5-bifosfato, expondo o grupo amino da Lys para a carbamoilação não enzimática pelo $CO_2$; segue-se, então, a ligação do $Mg^{2+}$, que ativa a rubisco. Em algumas espécies, a rubisco-ativase é ativada pela luz por meio de um mecanismo redox semelhante àquele mostrado na Figura 20-19.

**FIGURA 20-8 Papel da rubisco-ativase na carbamoilação de $Lys^{201}$ da rubisco.** Quando o substrato ribulose-1,5-bifosfato está ligado ao sítio ativo, a $Lys^{201}$ não está acessível. A rubisco-ativase acopla a hidrólise de ATP à expulsão do açúcar bifosfato ligado, expondo a $Lys^{201}$; este resíduo de Lys pode agora ser carbamoilado com $CO_2$ em uma reação que é aparentemente não mediada por enzimas. O $Mg^{2+}$ é atraído e se liga ao carbamoil-Lys negativamente carregado e a enzima é, então, ativada.

Outro mecanismo de regulação envolve o "inibidor noturno" 2-carboxiarabinitol-1-fosfato, um análogo de estado de transição de ocorrência natural (p. 210), com estrutura similar àquela do intermediário $\beta$-cetoácido da reação da rubisco (Figura 20-7). Esse composto, sintetizado no escuro em algumas plantas, é um potente inibidor da rubisco carbamoilada. Ele é degradado quando a luz retorna, ou então é expelido pela rubisco-ativase, ativando a rubisco.

$$\begin{array}{c} CH_2-O-PO_3^{2-} \\ | \\ HO-C-C(=O)O^- \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ CH_2OH \end{array}$$

2-Carboxiarabinitol-1-fosfato

**Estágio 2: Conversão de 3-fosfoglicerato em gliceraldeído-3-fosfato** O 3-fosfoglicerato formado no estágio 1 é convertido em gliceraldeído-3-fosfato em duas etapas que são essencialmente o inverso das etapas correspondentes na glicólise, com uma exceção: o nucleotídeo cofator para a redução do 1,3-bifosfoglicerato é NADPH em vez de NADH (**Figura 20-9**). O estroma do cloroplasto contém todas as enzimas glicolíticas, exceto a fosfoglicerato-mutase. As enzimas estromais e citosólicas são isoenzimas; ambos os conjuntos de enzimas catalisam as mesmas reações, mas são produtos de genes diferentes.

Na primeira etapa do estágio 2, a **3-fosfoglicerato-cinase** estromal catalisa a transferência de um grupo fosforil do ATP ao 3-fosfoglicerato, produzindo 1,3-bifosfoglicerato. A seguir, o NADPH doa elétrons em uma redução catalisada pela isoenzima da **gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase** específica dos cloroplastos, produzindo gliceraldeído-3-fosfato e $P_i$. As altas concentrações de NADPH e ATP no estroma do cloroplasto permitem que este par de reações termodinamicamente desfavoráveis proceda na direção do 1,3-bifosfoglicerato. A triose-fosfato-isomerase interconverte então gliceraldeído-3-fosfato e di-hidroxiacetona-fosfato. A maior parte das trioses fosfato então produzidas é usada para regenerar ribulose-1,5-bifosfato; o restante é convertido em amido no cloroplasto e armazenado para uso futuro, ou é exportado imediatamente ao citosol e convertido em sacarose para transporte às regiões em crescimento da planta. Em folhas em desenvolvimento, uma porção significativa das trioses-fosfato pode ser degradada pela glicólise para fornecer energia.

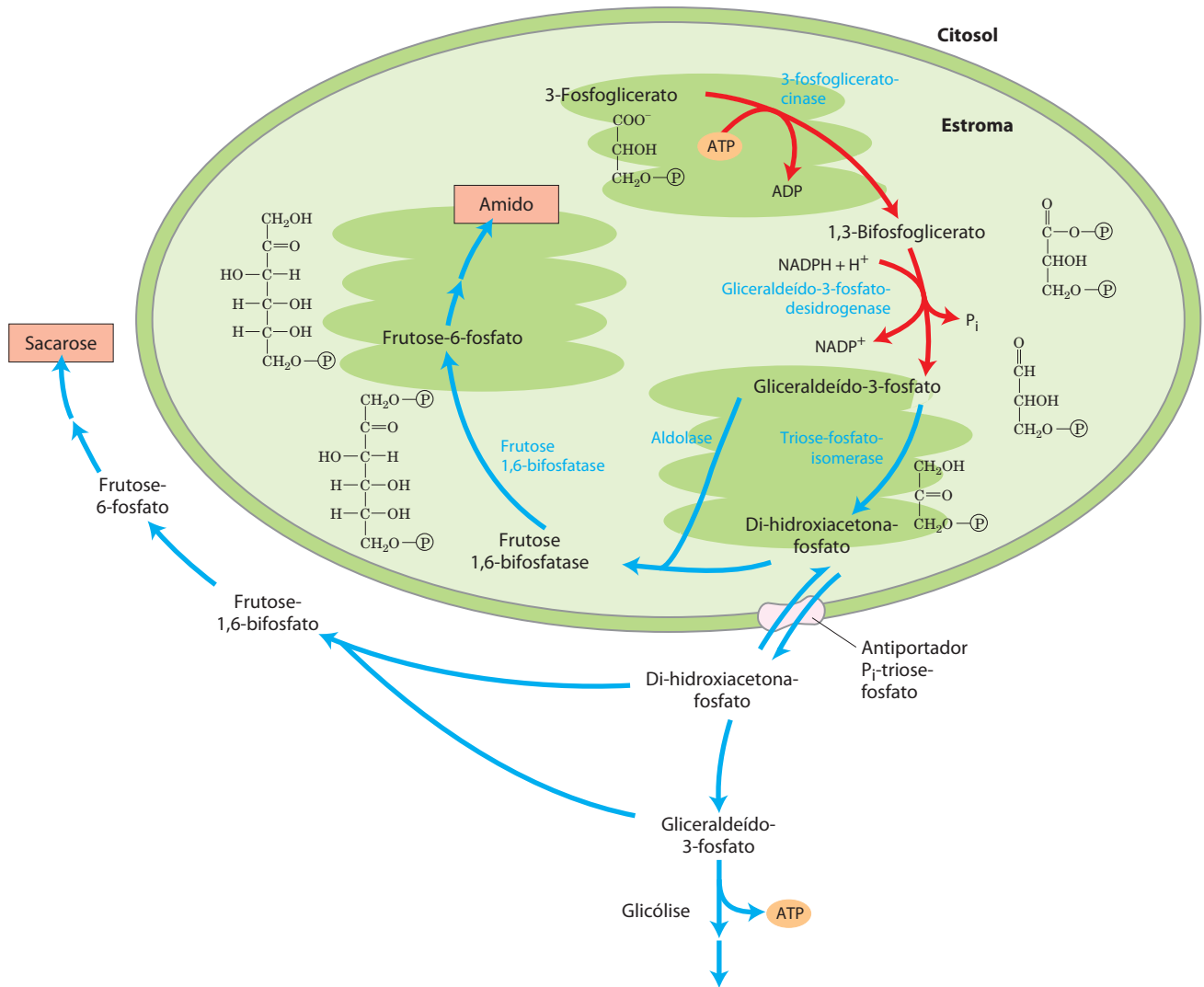



**FIGURA 20-9** **Segundo estágio da assimilação de $CO_2$.** O 3-fosfoglicerato é convertido em gliceraldeído-3-fosfato (setas vermelhas). Também ilustrados estão os destinos alternativos do carbono fixado no gliceraldeído-3--fosfato (setas azuis). A maior parte do gliceraldeído-3-fosfato é reciclada a ribulose-1,5-bifosfato, como mostrado na Figura 20-10. Uma pequena fração do gliceraldeído-3-fosfato "extra" pode ser imediatamente utilizada como fonte de energia, mas a maioria é convertida em sacarose para transporte ou armazenada nos cloroplastos como amido. Neste último caso, o gliceraldeído-3-fosfato se condensa com di-hidroxiacetona-fosfato no estroma para formar frutose-1,6-bifosfato, precursor do amido. Em outras situações, o gliceraldeído-3-fosfato é convertido em di-hidroxiacetona-fosfato, que deixa o cloroplasto por meio de um transportador específico (ver Figura 20-15) e, no citosol, pode ser degradado glicoliticamente para prover energia ou ser usado para formar frutose-6-fosfato e, então, sacarose.

**Estágio 3: Regeneração da ribulose-1,5-bifosfato a partir das trioses--fosfato** A primeira reação na assimilação de $CO_2$ em trioses-fosfato consome ribulose-1,5-bifosfato e, para um fluxo contínuo de $CO_2$ para carboidrato, a ribulose-1,5-bifosfato precisa ser constantemente regenerada. Isto é alcançado por uma série de reações (**Figura 20-10**) que, junto com os estágios 1 e 2, constituem a via cíclica mostrada na Figura 20-4. O produto da primeira reação de assimilação (3-fosfoglicerato) sofre então transformações que regeneram a ribulose-1,5-bifosfato. Os intermediários nesta via incluem açúcares de três, quatro, cinco, seis e sete carbonos. Na discussão que segue, todos os números das etapas se referem à Figura 20-10.

A etapas ❶ e ❹ são catalisadas pela mesma enzima, a **aldolase**. Ela catalisa inicialmente a condensação reversível de gliceraldeído-3-fosfato com di-hidroxiacetona-fosfato, produzindo frutose-1,6-bifosfato (etapa ❶); esta é hidrolisada em frutose-6-fosfato e $P_i$ pela frutose-1,6-bifosfatase (FBPase-1) na etapa ❷. A reação é fortemente exergônica e essencialmente irreversível. A etapa ❸ é catalisada pela **transcetolase**, que contém tiamina-pirofosfato (TPP) como seu grupo prostético (ver Figura 14-15a) e requer $Mg^{2+}$. A transcetolase catalisa a transferência reversível de um grupo cetol de dois carbonos ($CH_2OH—CO—$) a partir de um doador cetose-fosfato, a frutose-6-fosfato, para um aceptor aldose-fosfato, o gliceraldeído-3-fosfato (**Figu-**

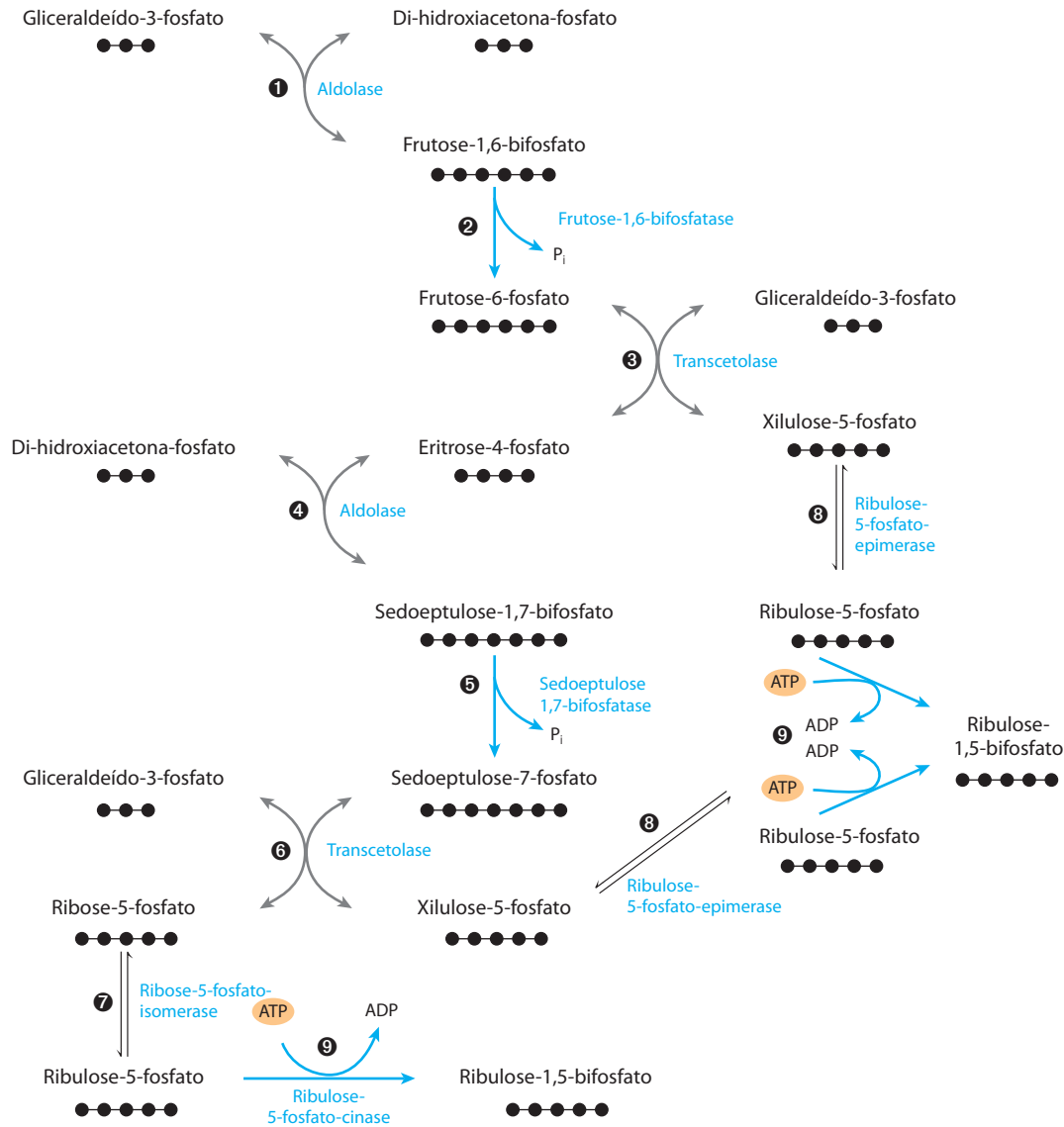



**FIGURA 20-10** **Terceiro estágio da assimilação de $CO_2$.** Este diagrama esquemático mostra as interconversões das trioses-fosfato e das pentoses-fosfato. Os círculos pretos representam o número de carbonos em cada composto. Os materiais de origem são o gliceraldeído-3-fosfato e a di-hidroxiacetona-fosfato. As reações catalisadas pela aldolase (❶ e ❹) e pela transcetolase (❸ e ❻) produzem pentoses-fosfato que são convertidas em ribulose-1,5-bifosfato – a ribose-5-fosfato pela ribose-5-fosfato-isomerase ❼ e a xilulose-5-fosfato pela ribulose-5-fosfato-epimerase ❽. Na etapa ❾, a ribulose-5-fosfato é fosforilada, regenerando ribulose-1,5-bifosfato. As etapas com setas azuis são exergônicas e tornam o processo todo irreversível: as etapas ❷ da frutose-1,6-bifosfatase, ❺ da sedoeptulose-bifosfatase e ❾ da ribulose-5-fosfato-cinase.

**ra 20-11a, b**), formando a pentose-xilulose-5-fosfato e a tetrose-eritrose-4-fosfato. Na etapa ❹, a aldolase age novamente, combinando eritrose-4-fosfato com di-hidroxiacetona fosfato, para formar a **sedoeptulose-1,7-bifosfato** de sete carbonos. A sedoeptulose-1,7-bifosfatase, enzima exclusiva dos plastídeos, converte o bifosfato a sedoeptulose-7-fosfato (etapa ❺); esta é a segunda reação irreversível na via. A transcetolase age então novamente, convertendo sedoeptulose-7-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato em duas pentoses-fosfato na etapa ❻ (Figura 20-11c). A **Figura 20-12** mostra como um fragmento de dois carbonos é temporariamente carregado no cofator TPP da transcetolase e condensado com os três carbonos do gliceraldeído-3-fosfato na etapa ❻.

As pentoses-fosfato formadas nas reações da transcetolase – ribose-5-fosfato e xilulose-5-fosfato – são convertidas em **ribulose-5-fosfato** (etapas ❼ e ❽), a qual, na etapa final ❾ do ciclo, é fosforilada pela ribulose-5-fosfato-cinase, produzindo ribulose-1,5-bifosfato (**Figura 20-13**). Essa é a terceira reação muito exergônica da via, uma vez que a energia da ligação fosfato-anidrido no ATP é trocada por uma ligação éster-fosfato na ribulose-1,5-bifosfato.

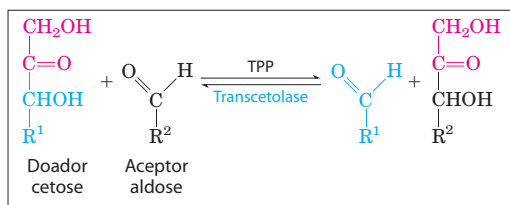
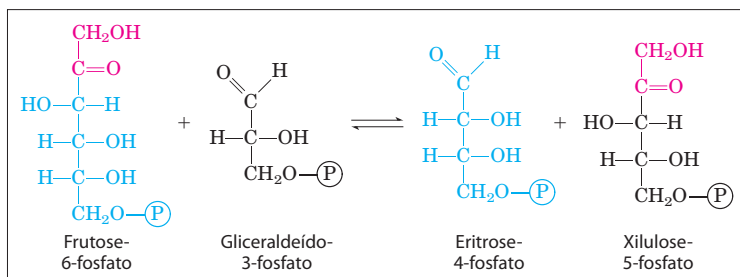
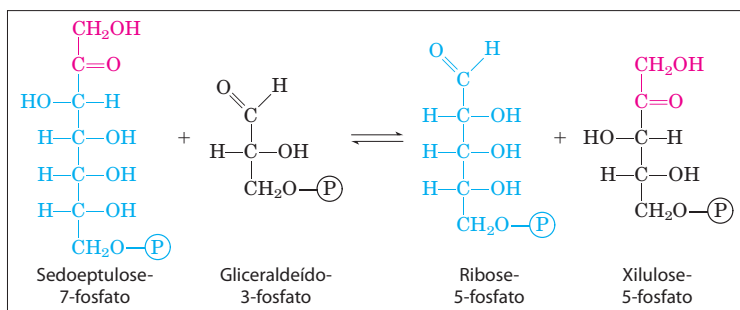



**FIGURA 20-11 Reações do ciclo de Calvin catalisadas pela transcetolase.** **(a)** Reação geral catalisada pela transcetolase: a transferência de um grupo de 2 carbonos, temporariamente carregado na TPP ligada à enzima, de um doador cetose a um aceptor aldose. **(b)** Conversão de uma hexose e de uma triose em açúcares de quatro e cinco carbonos (etapa ❸ da Figura 20-10). **(c)** Conversão de açúcares de sete e de três carbonos em duas pentoses (etapa ❻ da Figura 20-10).

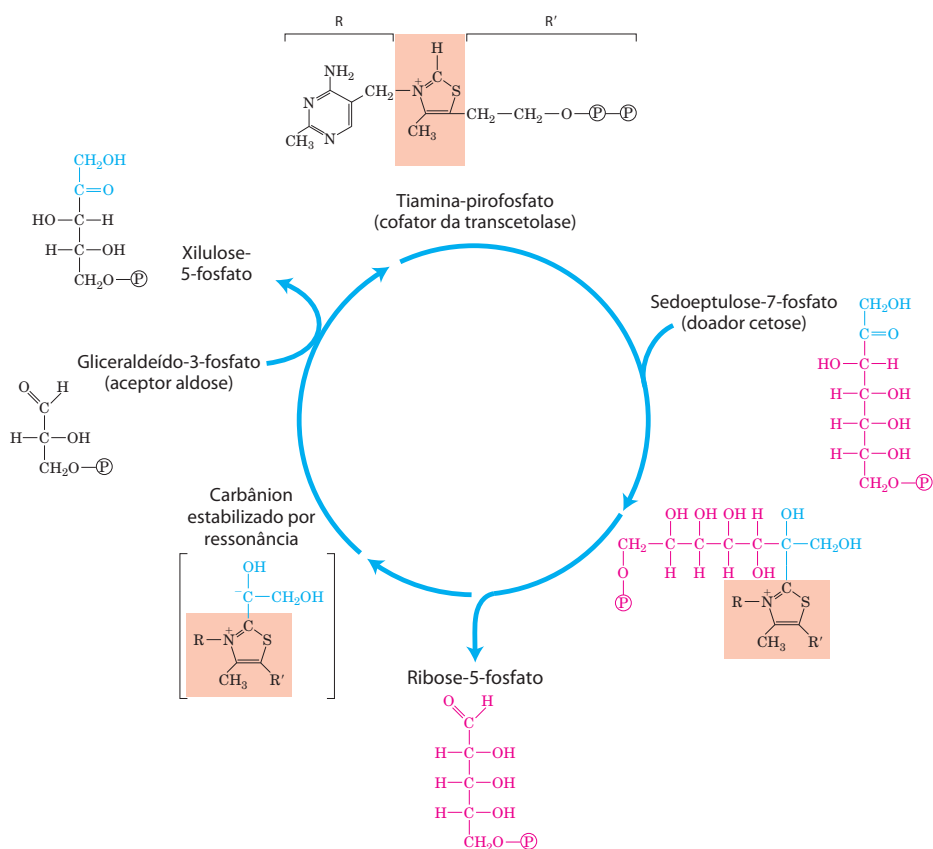



**FIGURA 20-12 TPP como cofator para a transcetolase.** A transcetolase transfere um grupo de dois carbonos da sedoeptulose-7-fosfato ao gliceraldeído-3-fosfato, produzindo duas pentoses-fosfato (etapa ❻ da Figura 20-10). A tiamina-pirofosfato serve como um carregador temporário da unidade de dois carbonos e como um sugadouro de elétrons (ver Figura 14-15), para facilitar as reações.

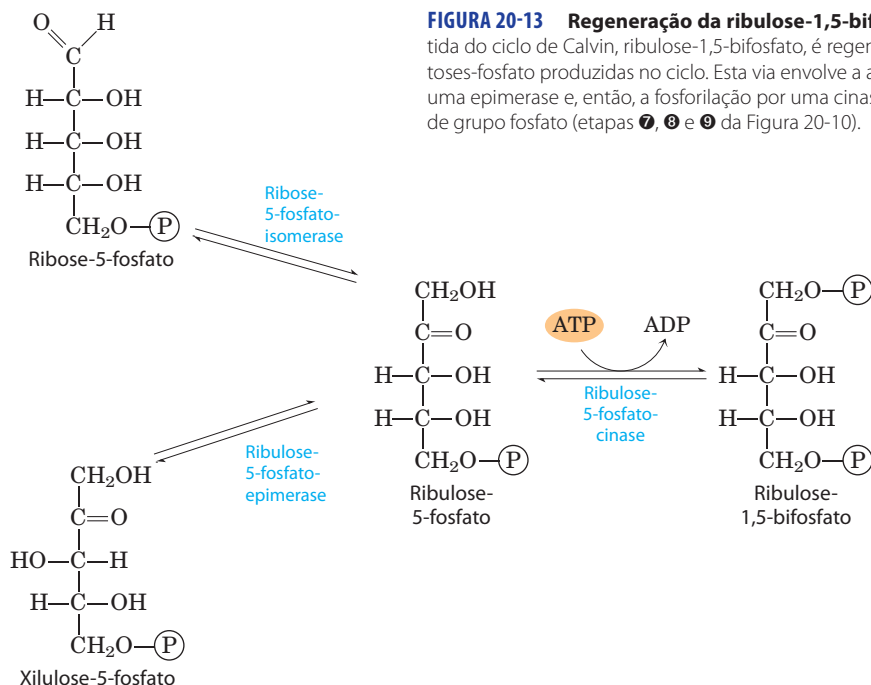



**FIGURA 20-13 Regeneração da ribulose-1,5-bifosfato.** O material de partida do ciclo de Calvin, ribulose-1,5-bifosfato, é regenerado a partir de duas pentoses-fosfato produzidas no ciclo. Esta via envolve a ação de uma isomerase e de uma epimerase e, então, a fosforilação por uma cinase, com ATP como o doador de grupo fosfato (etapas ❼, ❽ e ❾ da Figura 20-10).

## A síntese de cada triose-fosfato a partir do $CO_2$ requer seis NADPH e nove ATP

O resultado líquido de três voltas do ciclo de Calvin é a conversão de três moléculas de $CO_2$ e uma molécula de fosfato em uma molécula de triose-fosfato. A estequiometria da via global, do $CO_2$ à triose-fosfato, com a regeneração da ribulose-1,5-bifosfato, é mostrada na **Figura 20-14**. Três moléculas de ribulose-1,5-bifosfato (um total de 15 carbonos) se condensam com 3 $CO_2$ (3 carbonos) para formar seis moléculas de 3-fosfoglicerato (18 carbonos). Essas seis moléculas de 6-fosfoglicerato são reduzidas a seis moléculas de gliceraldeído-3-fosfato (que está em equilíbrio com di-hidroxiacetona-fosfato), com o gasto de seis ATP

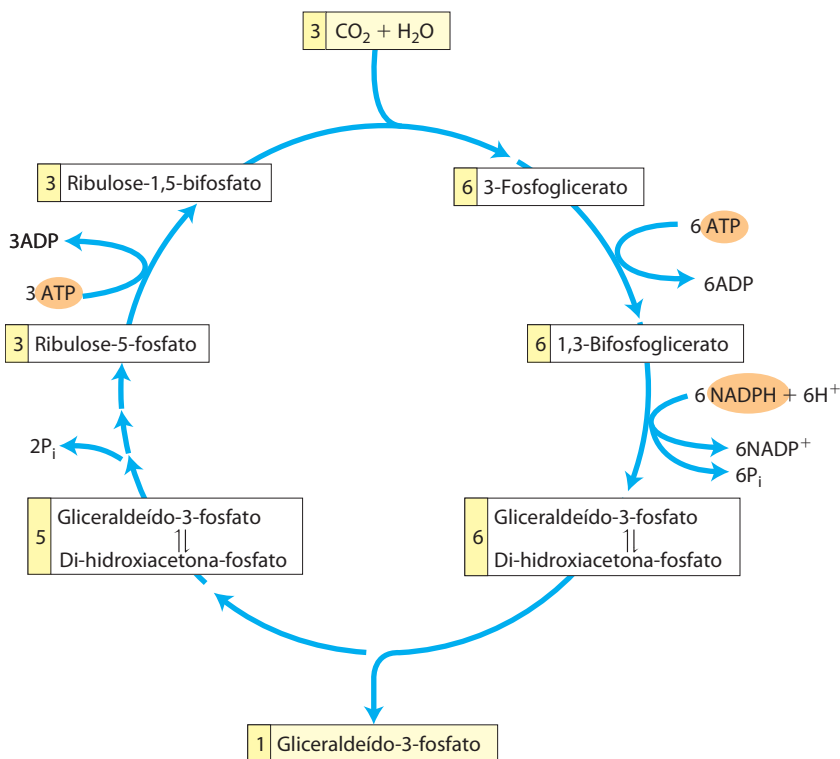



**FIGURA 20-14 Estequiometria da assimilação de $CO_2$ no ciclo de Calvin.** Para cada três moléculas de $CO_2$ fixadas, uma molécula de triose-fosfato (gliceraldeído-3-fosfato) é produzida e nove ATP e seis NADPH são consumidos.

(na síntese de 1,3-bifosfoglicerato) e seis NADPH (na redução do 1,3-bifosfoglicerato a gliceraldeído-3-fosfato). A isoenzima da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase presente nos cloroplastos pode usar NADPH como seu carreador de elétrons e normalmente funciona na direção da redução do 1,3-bifosfoglicerato. A isoenzima citosólica usa NAD, da mesma forma que a enzima glicolítica de animais e de outros eucariotos e, no escuro, essa enzima age na glicólise, oxidando o gliceraldeído-3-fosfato. As duas isoenzimas da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, como todas as enzimas, catalisam a reação nas duas direções.

Uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato é o produto líquido da via de assimilação de carbono. As outras cinco moléculas de triose-fosfato (15 carbonos) são rearranjadas nas etapas de ❶ a ❾ da Figura 20-10, para formar três moléculas de ribulose-1,5-bifosfato (15 carbonos). A última etapa nessa conversão requer um ATP por ribulose-1,5-bifosfato, ou um total de 3 ATP. Assim, em resumo, para cada molécula de triose-fosfato produzida pela assimilação fotossintética de $CO_2$, seis NADPH e nove ATP são necessários.

NADPH e ATP são produzidos nas reações dependentes de luz da fotossíntese em uma razão (2:3) aproximadamente igual àquela em que são consumidos no ciclo de Calvin. Nove moléculas de ATP são convertidas em ADP e fosfato na geração de uma molécula de triose-fosfato; oito dos fosfatos são liberados com $P_i$ e combinados com 8 ADPs para regenerar ATP. O nono fosfato é incorporado na própria triose-fosfato. Para converter o nono ADP em ATP, uma molécula de $P_i$ precisa ser importada do citosol, conforme será visto a seguir.

No escuro, a produção de ATP e NADPH pela fotofosforilação e a incorporação de $CO_2$ na triose-fosfato (pelas chamadas reações do escuro) cessam. As "reações do escuro" da fotossíntese foram assim chamadas para distingui-las das reações *basicamente* estimuladas pela luz, de transferência de elétrons ao $NADP^+$ e de síntese de ATP, descritas no Capítulo 19. Na realidade, elas não ocorrem em velocidades significativas no escuro e são, portanto, mais adequadamente chamadas de **reações de assimilação de carbono**. Posteriormente nesta seção serão descritos os mecanismos de regulação que acionam a assimilação de carbono na luz e a "desligam" no escuro.

O estroma do cloroplasto contém todas as enzimas necessárias para converter as trioses-fosfato produzidas pela assimilação de $CO_2$ (gliceraldeído-3-fosfato e di-hidroxiacetona-fosfato) em amido, temporariamente armazenado no cloroplasto na forma de grânulos insolúveis. A aldolase condensa as trioses produzindo frutose-1,6-bifosfato; a frutose-1,6-bifosfatase produz frutose-6-fosfato; a fosfoexose-isomerase gera glicose-6-fosfato, e a fosfoglicomutase produz glicose-1-fosfato, o material inicial para a síntese de amido (ver Seção 20.3).

Todas as reações do ciclo de Calvin, exceto aquelas catalisadas pela rubisco, pela sedoeptulose-1,7-bifosfatase e pela ribulose-5-fosfato-cinase, também ocorrem em tecidos animais. Sem essas três enzimas, os animais não conseguem realizar a conversão líquida de $CO_2$ em glicose.

## Um sistema de transporte exporta trioses-fosfato do cloroplasto e importa fosfato

A membrana interna do cloroplasto é impermeável à maioria dos compostos fosforilados, incluindo frutose-6-fosfato, glicose-6-fosfato e frutose-1,6-bifosfato. Entretanto, ela tem um antiportador específico que catalisa a troca, na proporção de um por um, de $P_i$ por triose-fosfato, que pode ser di-hidroxiacetona-fosfato ou 3-fosfoglicerato (**Figura 20-15**; ver também Figura 20-9). Esse antiportador move simultaneamente $P_i$ para dentro do cloroplasto, onde ele é usado na fotofosforilação, e triose-fosfato para o citosol, onde ela pode ser usada para sintetizar sacarose, a forma na qual o carbono fixado é transportado para tecidos vegetais distantes.

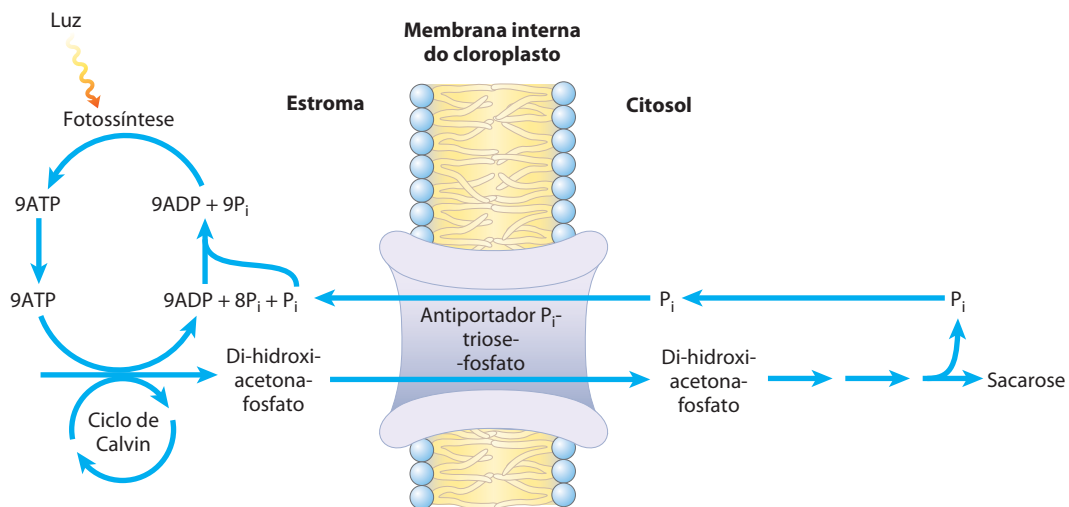



**FIGURA 20-15 O sistema antiporte $P_i$-triose-fosfato da membrana interna do cloroplasto.** Este transportador facilita a troca de $P_i$ citosólico por di-hidroxiacetona-fosfato estromal. Os produtos da assimilação fotossintética de carbono são então movidos para o citosol, onde servem como ponto de partida para a biossíntese de sacarose, e o $P_i$ necessário para a fotofosforilação é levado para o estroma. Este mesmo antiportador pode transportar 3-fosfoglicerato e age na lançadeira de exportação de equivalentes de ATP e de equivalentes redutores (ver Figura 20-16).

A síntese de sacarose no citosol e a síntese de amido no cloroplasto são as principais vias pelas quais o excesso de triose-fosfato da fotossíntese é utilizado. A síntese de sacarose (descrita a seguir) libera quatro moléculas de $P_i$ das quatro trioses-fosfato necessárias para produzir sacarose. Para cada molécula de triose-fosfato removida do cloroplasto, um $P_i$ é transportado para o cloroplasto, fornecendo o nono $P_i$ mencionado anteriormente, a ser usado na regeneração do ATP. Se essa troca fosse bloqueada, a síntese de trioses-fosfato rapidamente esgotaria o $P_i$ disponível no cloroplasto, diminuindo a síntese de ATP e suprimindo a assimilação de $CO_2$ na forma de amido.

O sistema antiporte $P_i$-triose-fosfato também serve para uma função adicional. O ATP e o poder redutor são necessários no citosol para uma variedade de reações sintéticas e que demandam energia. Essas necessidades são satisfeitas em um grau ainda indeterminado pela mitocôndria, mas uma segunda fonte potencial de energia é o ATP e o NADPH gerados no estroma do cloroplasto durante as reações da luz. No entanto, nem o ATP nem o NADPH podem cruzar a membrana do cloroplasto. O sistema antiporte $P_i$-triose-fosfato tem o efeito indireto de mover equivalentes de ATP e equivalentes redutores do cloroplasto para o citosol (**Figura 20-16**). A di-hidroxiacetona-fosfato formada no estroma é transportada para o citosol, onde é convertida, por enzimas glicolíticas, em 3-fosfoglicerato, gerando ATP e NADH. O 3-fosfoglicerato entra novamente no cloroplasto, completando o ciclo.

## Quatro enzimas do ciclo de Calvin são indiretamente ativadas pela luz

A assimilação redutora de $CO_2$ requer muito ATP e NADPH, e suas concentrações no estroma aumentam quando os cloroplastos são iluminados (**Figura 20-17**). O transporte de prótons através da membrana tilacoide, promovido pela luz (Capítulo 19), também aumenta o pH estromal de aproximadamente 7 para cerca de 8, sendo acompanhado por um fluxo de $Mg^{2+}$ do compartimento do tilacoide para o estroma, aumentando a [$Mg^{2+}$] de 1 a 3 mM para 3 a 6 mM. Várias

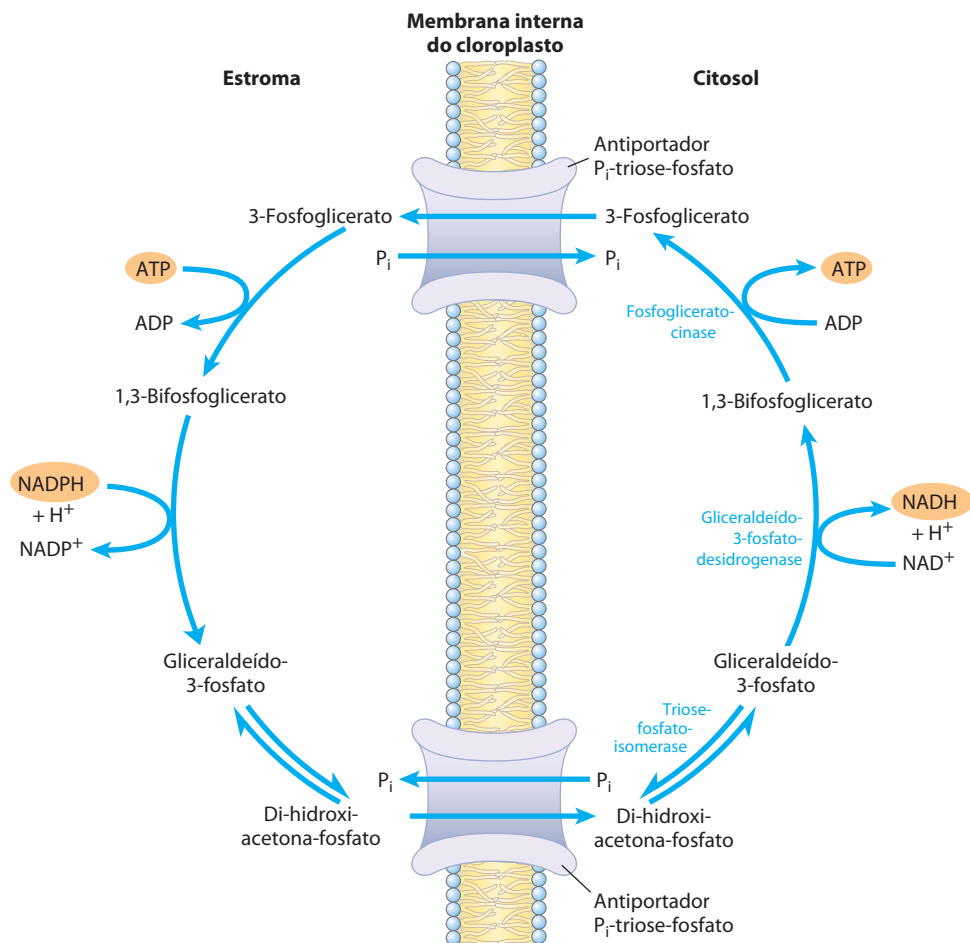



**FIGURA 20-16 O papel do antiportador $P_i$-triose-fosfato no transporte de equivalentes de ATP e equivalentes redutores.** A di-hidroxiacetona-fosfato deixa o cloroplasto, sendo convertida em gliceraldeído-3-fosfato no citosol. As reações da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase citosólica e da fosfoglicerato-cinase produzem então NADH, ATP e 3-fosfoglicerato. O último volta ao cloroplasto e é reduzido a di-hidroxiacetona-fosfato, completando um ciclo que efetivamente move ATP e equivalentes redutores (NAD(P)H) do cloroplasto ao citosol.

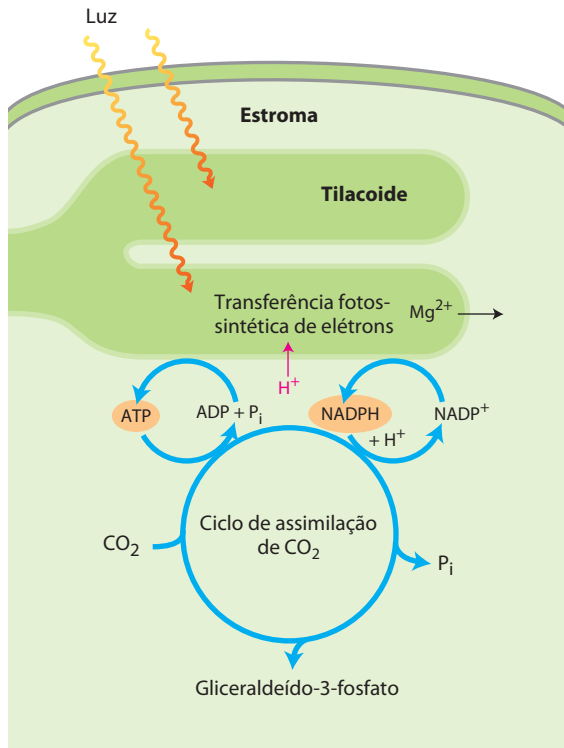



**FIGURA 20-17 Fonte de ATP e de NADPH.** O ATP e o NADPH produzidos pelas reações da luz são substratos essenciais para a redução do $CO_2$. As reações fotossintéticas que produzem ATP e NADPH são acompanhadas pelo movimento de prótons (em cor-de-rosa) do estroma para dentro do tilacoide, criando condições alcalinas no estroma. Íons magnésio passam do tilacoide para o estroma, aumentando a $[Mg^{2+}]$ estromal.

**FIGURA 20-18 Ativação da frutose-1,6-bifosfatase do cloroplasto.** A frutose-1,6-bifosfatase reduzida (FBPase-1) é ativada pela luz e pela combinação de pH alto e $[Mg^{2+}]$ alta no estroma, ambos resultantes da iluminação.

enzimas do estroma evoluíram para tirar vantagem dessas condições promovidas pela luz, que sinalizam a disponibilidade de ATP e de NADPH: as enzimas são mais ativas em um ambiente alcalino e em alta $[Mg^{2+}]$. Por exemplo, a ativação da rubisco pela formação de carbamoil-lisina é mais rápida em pH alcalino e uma alta $[Mg^{2+}]$ estromal favorece a formação do complexo ativo com $Mg^{2+}$ da enzima. A frutose-1,6-bifosfatase requer $Mg^{2+}$ e é muito dependente do pH (**Figura 20-18**); sua atividade aumenta mais do que 100 vezes quando o pH e a $[Mg^{2+}]$ aumentam durante a iluminação do cloroplasto.

Quatro enzimas do ciclo de Calvin estão sujeitas a um tipo especial de regulação pela luz. A ribulose-5-fosfato-cinase, a frutose-1,6-bifosfatase, a sedoeptulose-1,7-bifosfatase e a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase são ativadas pela redução promovida pela luz de ligações dissulfeto entre dois resíduos de Cys críticos às suas atividades catalíticas. Quando esses resíduos de Cys apresentam essas ligações dissulfeto (oxidados), as enzimas estão inativas. Essa é a situação normal no escuro. Com a iluminação, os elétrons fluem do fotossistema I à ferredoxina (ver Figura 19-58), a qual passa elétrons a uma proteína contendo dissulfeto, pequena e solúvel, chamada de **tiorredoxina** (**Figura 20-19**), em uma reação catalisada pela **ferredoxina-tiorredoxina-redutase.** A tiorredoxina reduzida doa elétrons para a redução das ligações dissulfeto das

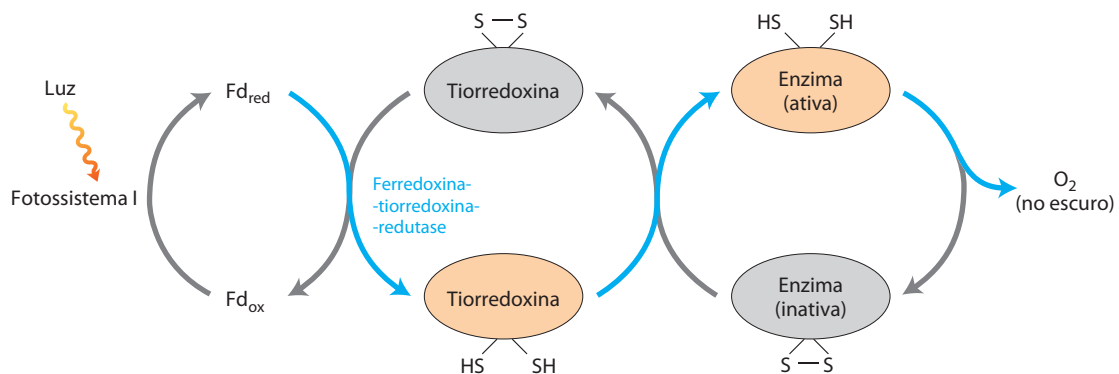



**FIGURA 20-19 Ativação pela luz de várias enzimas do ciclo de Calvin.** A ativação pela luz é mediada pela tiorredoxina, pequena proteína que contém dissulfeto. Na presença de luz, a tiorredoxina é reduzida por elétrons que se movem do fotossistema I, através da ferredoxina (Fd) (setas azuis); a tiorredoxina reduz então ligações dissulfeto críticas em cada uma das enzimas, sedoeptulose-1,7-bifosfatase, frutose-1,6-bifosfatase, ribulose-5-fosfato-cinase e gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, ativando estas enzimas. No escuro, os grupos —SH sofrem reoxidação a dissulfeto, inativando as enzimas.

enzimas ativadas pela luz e essas reações redutoras de clivagem são acompanhadas por mudanças conformacionais, que aumentam as atividades enzimáticas. Quando a noite cai, os resíduos de Cys nas quatro enzimas são reoxidados a suas formas dissulfeto, as enzimas são inativadas, e o ATP não é gasto na assimilação de $CO_2$. Em vez disso, o amido sintetizado e armazenado durante o dia é degradado para alimentar a glicólise à noite.

A glicose-6-fosfato-desidrogenase, a primeira enzima na via *oxidativa* das pentoses-fosfato, também é regulada por esse mecanismo de redução promovido pela luz, mas no sentido oposto. Durante o dia, quando a fotossíntese produz muito NADPH, essa enzima não é necessária para a produção de NADPH. A redução de uma ligação dissulfeto crítica por elétrons da ferredoxina *inativa* a enzima.

### RESUMO 20.1 Síntese fotossintética de carboidratos

- A fotossíntese em plantas vasculares ocorre nos cloroplastos. Nas reações de assimilação de $CO_2$ (o ciclo de Calvin), o ATP e o NADPH são usados para reduzir $CO_2$ a trioses-fosfato. Essas reações ocorrem em três estágios: a reação de fixação propriamente dita, catalisada pela rubisco, a redução do 3-fosfoglicerato resultante a gliceraldeído-3-fosfato e a regeneração da ribulose-1,5--bifosfato a partir das trioses-fosfato.
- A rubisco condensa o $CO_2$ com a ribulose-1,5-bifosfato, formando uma hexose-bifosfato instável, que se divide em duas moléculas de 3-fosfoglicerato. A rubisco é ativada por uma modificação covalente (carbamoilação da $Lys^{201}$) catalisada pela rubisco-ativase e é inibida por um análogo natural de estado de transição, cuja concentração aumenta no escuro e diminui durante o dia.
- Isoenzimas estromais das enzimas glicolíticas catalisam a redução de 3-fosfoglicerato a gliceraldeído-3-fosfato; a redução de cada molécula requer um ATP e um NADPH.
- As enzimas estromais, incluindo transcetolase e aldolase, rearranjam os esqueletos de carbono das trioses-fosfato, gerando intermediários de três, quatro, cinco, seis e sete carbonos e, por fim, gerando pentoses-fosfato. As pentoses-fosfato são convertidas em ribulose-5-fosfato e, então, fosforiladas, produzindo ribulose-1,5-bifosfato para completar o ciclo de Calvin.
- O custo de fixar três $CO_2$ em uma triose-fosfato é de nove ATP e seis NADPH, providos pelas reações dependentes de luz da fotossíntese.
- Um antiportador na membrana interna do cloroplasto troca $P_i$ no citosol por 3-fosfoglicerato ou di-hidroxiacetona-fosfato produzidos pela assimilação de $CO_2$ no estroma. A oxidação da di-hidroxiacetona-fosfato no citosol gera ATP e NADH, assim movendo ATP e equivalentes redutores do cloroplasto ao citosol.
- Quatro enzimas do ciclo de Calvin são ativadas indiretamente pela luz, sendo inativas no escuro, de forma que a síntese de hexoses não compete com a glicólise – necessária para fornecer energia no escuro.

## 20.2 Fotorrespiração e as vias $C_4$ e CAM

Conforme foi visto, as células fotossintéticas produzem $O_2$ (pela quebra da água) durante as reações promovidas pela luz (Capítulo 19) e usam $CO_2$ durante os processos independentes da luz (descritos anteriormente), de forma que a mudança líquida de gases durante a fotossíntese é a captação de $CO_2$ e a liberação de $O_2$:

$$CO_2 + H_2O \longrightarrow O_2 + (CH_2O)$$

No escuro, as plantas também realizam a **respiração mitocondrial**, a oxidação de substratos até $CO_2$ e a conversão de $O_2$ em $H_2O$. Existe um outro processo em plantas que, da mesma forma que a respiração mitocondrial, consome $O_2$ e produz $CO_2$ e, assim como a fotossíntese, é promovido pela luz. Esse processo, a **fotorrespiração**, é um lado dispendioso da fotossíntese, resultado da falta de especificidade da enzima rubisco. Esta seção descreve essa reação paralela e as estratégias que as plantas utilizam para minimizarem suas consequências metabólicas.

### A fotorrespiração resulta da atividade de oxigenase da rubisco

A rubisco não tem especificidade absoluta pelo $CO_2$ como substrato. O oxigênio molecular ($O_2$) compete com o $CO_2$ no sítio ativo e, cerca de uma vez a cada três ou quatro rodadas, a rubisco catalisa a condensação do $O_2$ com a ribulose-1,5-bifosfato para formar 3-fosfoglicerato e **2-fosfoglicolato** (**Figura 20-20**), produto metabolicamente inútil. Essa é a atividade de oxigenase, atribuída no nome completo da enzima: ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase/oxigenase. Como resultado da reação com $O_2$, não ocorre fixação de carbono e tal reação parece ser desvantajosa para a célula; resgatar os carbonos do 2-fosfoglicolato (pela via descrita a seguir) consome quantidades significativas de energia celular e libera $CO_2$ previamente fixado.

Considerando que a reação com o oxigênio é deletéria para o organismo, por que a evolução da rubisco produziu um sítio ativo incapaz de diferenciar bem o $CO_2$ do $O_2$? Talvez boa parte dessa evolução tenha ocorrido antes da época em que a produção de $O_2$ pelos organismos fotossintéticos começou a elevar o conteúdo de oxigênio na atmosfera, cerca de 2,5 bilhões de anos atrás. Antes dessa época, não havia pressão seletiva para que a rubisco diferenciasse o $CO_2$ do $O_2$. O $K_m$ para o $CO_2$ é de cerca de 9 $\mu$M e, para o $O_2$, de aproximadamente 350 $\mu$M. A atmosfera moderna contém cerca de 20% de $O_2$ e apenas 0,04% de $CO_2$, de forma que uma solução aquosa em equilíbrio com o ar à temperatura ambiente contém cerca de 250 $\mu$M de $O_2$ e 11 $\mu$M de $CO_2$ – concentrações que permitem "fixação" significativa de $O_2$ pela rubisco e, portanto, um desperdício significativo de energia. A dependência em relação à temperatura das solubilidades do $O_2$ e do $CO_2$ é tal que, em temperaturas mais elevadas, a razão de $O_2$ para $CO_2$ na solução aumenta. Além disso, a afinidade da rubisco por $CO_2$ diminui com o aumento da temperatura, exacerbando sua tendência de catalisar a reação de desperdício da oxigenase. À medida que o $CO_2$ é consumido

Ribulose-1,5-bifosfato

Forma enediol

$O_2$

Intermediário ligado à enzima

$OH^-$

$H_2O$

2-Fosfoglicolato

3-Fosfoglicerato

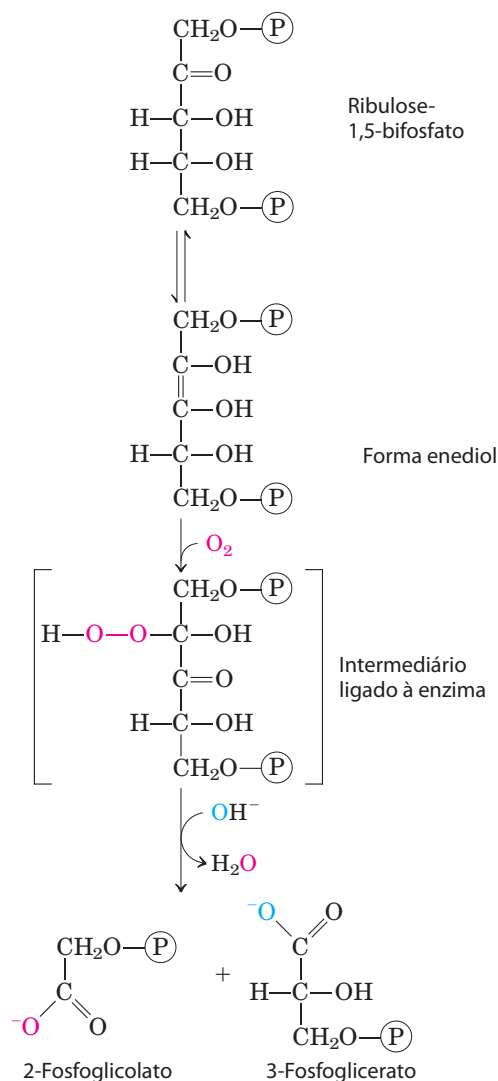



**FIGURA 20-20 Atividade de oxigenase da rubisco.** A rubisco pode incorporar $O_2$ em vez de $CO_2$ na ribulose-1,5-bifosfato. O intermediário instável então formado se divide em 2-fosfoglicolato (reciclado conforme descrito na Figura 20-21) e 3-fosfoglicerato, que pode reingressar no ciclo de Calvin.

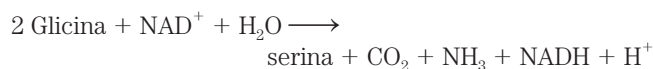
**FIGURA 20-21 Via do glicolato.** Esta via, que resgata o 2-fosfoglicolato (sombreado em cor-de-rosa) por sua conversão em serina e, por fim, em 3-fosfoglicerato, envolve três compartimentos celulares. O glicolato formado pela desfosforilação do 2-fosfoglicolato nos cloroplastos é oxidado a glioxilato nos peroxissomos, sendo então transaminado, produzindo glicina. Nas mitocôndrias, duas moléculas de glicina se condensam para formar serina e o $CO_2$ liberado durante a fotorrespiração (sombreado em verde). Esta reação é catalisada pela glicina-descarboxilase, enzima presente em concentrações muito elevadas nas mitocôndrias de plantas $C_3$ (ver texto). A serina é convertida em hidroxipiruvato e então em glicerato nos peroxissomos; o glicerato entra nos cloroplastos para ser fosforilado, juntando-se novamente ao ciclo de Calvin. O oxigênio (sombreado em azul) é consumido em duas etapas durante a fotorrespiração.

nas reações de assimilação, a razão de $O_2$ para $CO_2$ nos espaços de aeração da folha aumenta, favorecendo ainda mais a reação da oxigenase.

## A via de resgate do fosfoglicolato é onerosa

A **via do glicolato** converte duas moléculas de 2-fosfoglicolato em uma molécula de serina (três carbonos) e uma molécula de $CO_2$ (**Figura 20-21**). No cloroplasto, uma fosfatase converte 2-fosfoglicolato em glicolato, o qual é exportado ao peroxissomo. Lá, o glicolato é oxidado pelo oxigênio molecular, e o aldeído resultante (glioxilato) sofre transaminação, produzindo glicina. O peróxido de hidrogênio formado como subproduto da oxidação do glicolato é tornado inócuo por peroxidases no peroxissomo. A glicina passa do peroxissomo para a matriz mitocondrial, onde sofre descarboxilação oxidativa pelo complexo da

glicina-descarboxilase, enzima semelhante em estrutura e mecanismo aos dois complexos mitocondriais já estudados: o complexo da piruvato-desidrogenase e o complexo da $\alpha$-cetoglutarato-desidrogenase (Capítulo 16). O **complexo da glicina-descarboxilase** oxida a glicina a $CO_2$ e $NH_3$, com a concomitante redução de $NAD^+$ a NADH e a transferência do carbono remanescente da glicina para o cofator tetra-hidrofolato (**Figura 20-22**). A unidade de um carbono carregada no tetra-hidrofolato é então transferida a uma segunda molécula de glicina pela serina-hidroximetiltransferase, produzindo serina. A reação líquida catalisada pelo complexo da glicina-descarboxilase e pela serina-hidroximetiltransferase é

$$2 \text{ Glicina} + NAD^+ + H_2O \longrightarrow \text{serina} + CO_2 + NH_3 + NADH + H^+$$

A serina é convertida em hidroxipiruvato, em glicerato e, finalmente, em 3-fosfoglicerato, que é usado para regenerar a ribulose-1,5-bifosfato, completando o longo e oneroso ciclo (Figura 20-21).

Sob luz solar brilhante, o fluxo pela via de resgate do glicolato pode ser muito alto, produzindo cerca de cinco vezes mais $CO_2$ do que costuma ser produzido por todas as oxidações do ciclo do ácido cítrico. Para gerar esse grande fluxo, as mitocôndrias contêm grandes quantidades do complexo da glicina-descarboxilase: as quatro proteínas do complexo compreendem *metade* de toda a proteína na matriz mitocondrial em folha de plantas de ervilha e de espinafre! Em partes não fotossintéticas da planta, como nos tubérculos de batata, as mitocôndrias têm concentrações muito baixas do complexo da glicina-descarboxilase.

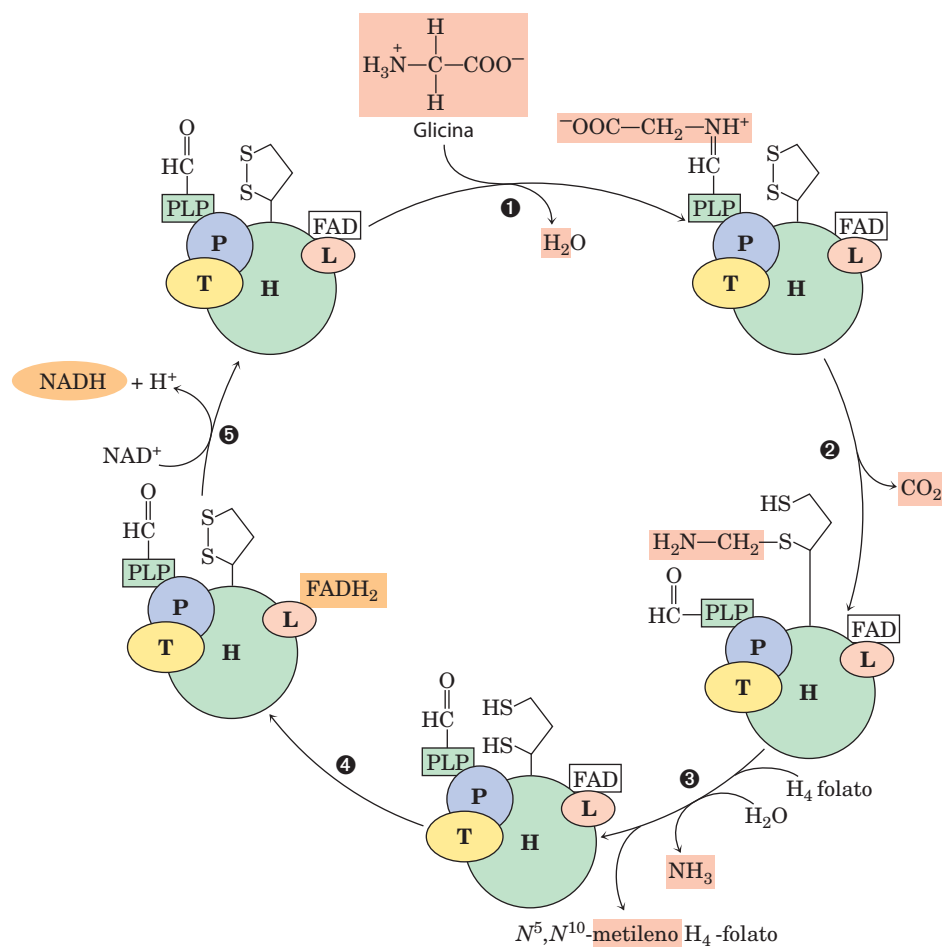



**FIGURA 20-22 O sistema da glicina-descarboxilase.** A glicina-descarboxilase em mitocôndrias vegetais é um complexo de quatro tipos de subunidades, com a estequiometria $P_4H_{27}T_9L_2$. A proteína H tem um resíduo de ácido lipoico covalentemente ligado, que pode sofrer oxidação reversível. A etapa ❶ é a formação de uma base de Schiff entre o piridoxal-fosfato (PLP) e a glicina, catalisada pela proteína P (denominada em função de seu PLP ligado). Na etapa ❷, a proteína P catalisa a descarboxilação oxidativa da glicina, liberando $CO_2$; o grupo metilamina remanescente é ligado a um dos grupos —SH do ácido lipoico reduzido. ❸ A proteína T (que usa tetra-hidrofolato [$H_4$-folato] como cofator) agora libera $NH_3$ da porção metilamina e transfere o fragmento remanescente de um carbono para o tetra-hidrofolato, produzindo $N^5,N^{10}$-metilenotetra-hidrofolato. ❹ A proteína L oxida os dois grupos —SH do ácido lipoico a um dissulfeto, passando elétrons através do FAD até o $NAD^+$ ❺, completando assim o ciclo. O $N^5,N^{10}$-metilenotetra-hidrofolato formado neste processo é usado pela serina-hidroximetiltransferase para converter uma molécula de glicina em serina, regenerando o tetra-hidrofolato, que é essencial para a reação catalisada pela proteína T. A subunidade L da glicina-descarboxilase é idêntica à di-hidrolipoil-desidrogenase ($E_3$) da piruvato-desidrogenase e da $\alpha$-cetoglutarato-desidrogenase (ver Figura 16-6).

As atividades combinadas da rubisco-oxigenase e da via de resgate do glicolato consomem $O_2$ e produzem $CO_2$ – daí o nome **fotorrespiração**. Talvez essa via fosse melhor chamada de **ciclo oxidativo fotossintético do carbono** ou **ciclo $C_2$**, nomes que não induzem a comparações com a respiração nas mitocôndrias. Ao contrário da respiração mitocondrial, a "fotorrespiração" não conserva energia e pode, na verdade, inibir a formação líquida de biomassa em até 50%. Essa ineficiência levou a adaptações evolutivas nos processos de assimilação de carbono, particularmente em plantas que evoluíram em climas quentes. A aparente ineficiência da rubisco e seu efeito em limitar a produção de biomassa inspiraram esforços de engenharia genética para fabricar uma rubisco "melhor", mas esse objetivo ainda não foi alcançado (Quadro 20–1).

## Em plantas $C_4$, a fixação do $CO_2$ e a atividade da rubisco são espacialmente separadas

Em muitas plantas que crescem nos trópicos (e em culturas de zonas temperadas nativas dos trópicos, como milho, cana-de-açúcar e sorgo), evoluiu um mecanismo que contornou o problema da dispendiosa fotorrespiração. A etapa na qual o $CO_2$ é fixado em um produto de três carbonos, o 3-fosfoglicerato, é precedida por várias etapas, uma das quais é a fixação temporária de $CO_2$ em um composto de quatro carbonos. As plantas que utilizam esse processo são chamadas de **plantas $C_4$** e o processo de assimilação, como **metabolismo $C_4$** ou **via $C_4$**. As plantas que utilizam o método de assimilação de carbono descrito até agora, onde a *primeira etapa* é a reação do $CO_2$ com a ribulose-1,5-bifosfato para formar 3-fosfoglicerato, são chamadas de **plantas $C_3$**.

As plantas $C_4$, que geralmente crescem em regiões de grande intensidade luminosa e altas temperaturas, têm várias características importantes: velocidade fotossintética alta, altas taxas de crescimento, baixas taxas de fotorrespiração, baixas taxas de perda de água e uma estrutura foliar especializada. A fotossíntese nas folhas de plantas $C_4$ envolve dois tipos de células: células do mesófilo e células da bainha vascular (**Figura 20-23a**). Existem três variantes do metabolismo $C_4$, estudadas na década de 1960 por Marshall Hatch e Rodger Slack (Figura 20-23b).

Em plantas de origem tropical, o primeiro intermediário no qual o $^{14}CO_2$ é fixado é o oxaloacetato, um composto de quatro carbonos. Essa reação, que ocorre no citosol das células do mesófilo foliar, é catalisada pela **fosfoenolpiruvato-carboxilase**, para a qual o substrato é o $HCO_3^-$ e não o $CO_2$. O oxaloacetato então formado é reduzido a malato à custa de NADPH (como mostrado na Figura 20-23b), ou convertido em aspartato por transaminação:

$$\text{Oxaloacetato} + \alpha\text{-aminoácido} \longrightarrow \text{L-aspartato} + \alpha\text{-cetoácido}$$

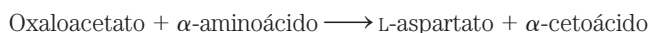
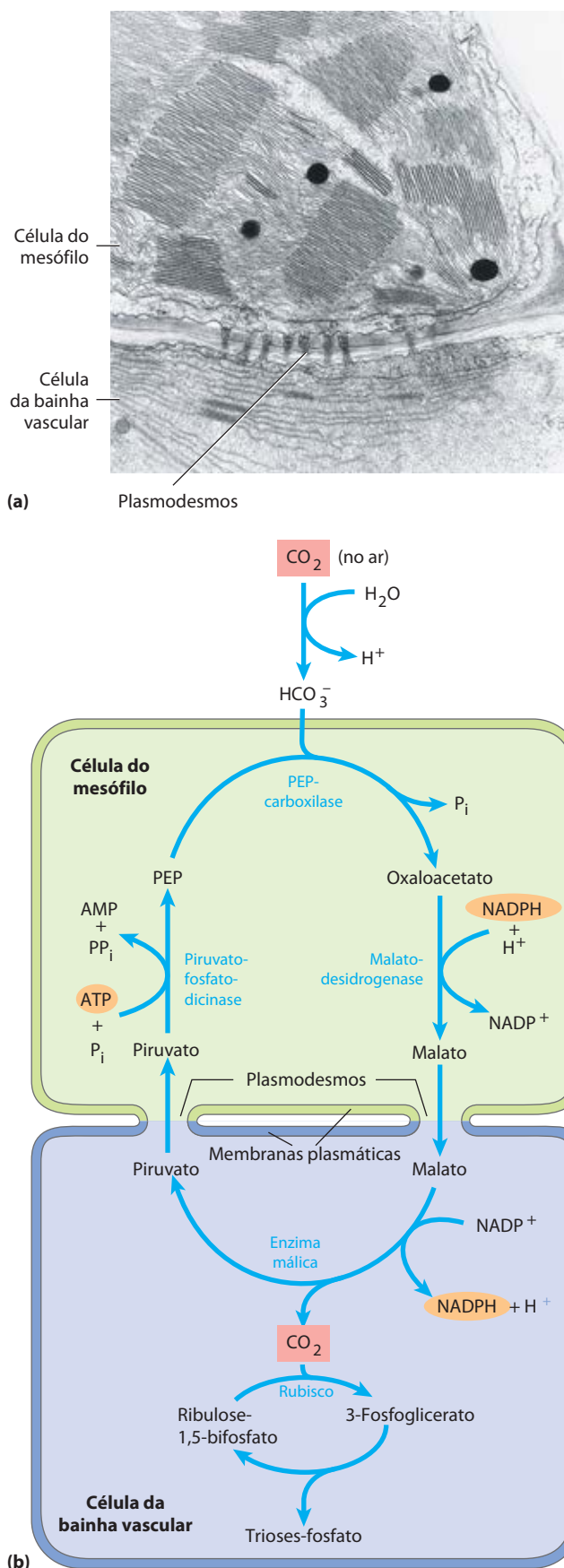



**FIGURA 20-23 Assimilação de carbono em plantas $C_4$.** A via $C_4$, envolvendo células do mesófilo e células da bainha vascular, predomina em plantas de origem tropical. **(a)** Micrografia eletrônica mostrando cloroplastos de células adjacentes do mesófilo e da bainha vascular. A célula da bainha vascular contém grânulos de amido. Plasmodesmos conectando as duas células são visíveis. **(b)** Via $C_4$ de assimilação de $CO_2$, que ocorre por meio de um intermediário de quatro carbonos.

## QUADRO 20-1 A engenharia genética aumentará a eficiência de organismos fotossintéticos?

Três problemas mundiais urgentes despertaram atenção séria para a possibilidade de se modificar as plantas para que elas sejam mais eficientes na conversão da luz solar em biomassa: o "efeito estufa" do aumento do $CO_2$ atmosférico sobre a mudança climática global, o declínio no suprimento de óleo para o fornecimento de energia e a necessidade de mais e melhores alimentos para a população mundial em crescimento.

A concentração de $CO_2$ na atmosfera terrestre tem aumentado continuamente ao longo dos últimos 50 anos (Figura Q-1) pelo efeito combinado do uso de combustíveis fósseis para energia e pela derrubada e queima de florestas tropicais para permitir o uso na agricultura. À medida que o $CO_2$ atmosférico aumenta, a atmosfera absorve mais do calor irradiado da superfície da terra e reirradia mais em direção à superfície do planeta (e em todas as outras direções). A retenção de calor aumenta a temperatura na superfície da terra; esse é o efeito estufa. Uma forma de limitar o aumento no $CO_2$ atmosférico seria criar plantas ou microrganismos com maior capacidade de sequestro de $CO_2$.

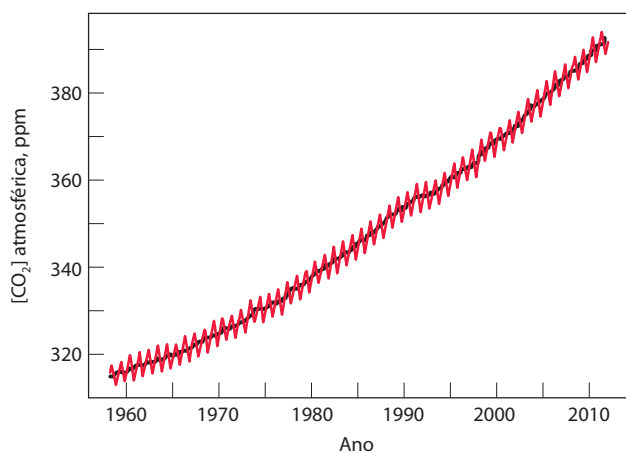



**FIGURA Q-1** A concentração de $CO_2$ na atmosfera medida no Observatório Mauna Loa, no Havaí. Dados da National Oceanic and Atmospheric Administration e do Scripps Institution of Oceanography $CO_2$ Program.

A quantidade estimada de carbono total em todos os sistemas terrestres (atmosfera, solo e biomassa) é de cerca de 3.200 gigatoneladas (GT) – 3.200 bilhões de toneladas métricas. A atmosfera contém outras 760 GT de $CO_2$.

O fluxo de carbono por esses reservatórios terrestres (Figura Q-2) deve-se grandemente às atividades fotossintéticas das plantas e das atividades de degradação dos microrganismos. As plantas fixam cerca de 123 GT de carbono por ano e liberam imediatamente cerca de metade disso para a atmosfera enquanto respiram. A maior parte do restante é gradualmente liberada para a atmosfera pela ação microbiana sobre a matéria vegetal morta, mas biomassa é sequestrada em plantas lenhosas e árvores por décadas ou séculos. O fluxo antropogênico de carbono, a quantidade de $CO_2$ liberada na atmosfera por atividades humanas, é de 9 GT por ano—pequena comparada com a biomassa total, mas suficiente para desequilibrar o balanço da natureza em direção a um aumento de $CO_2$ na atmosfera. Estima-se que as florestas da América do Norte sequestram 0,7 GT de carbono anualmente, que representa um décimo da produção anual *global* de $CO_2$ a partir dos combustíveis fósseis. Claramente, a preservação das florestas e o reflorestamento são maneiras efetivas para limitar o fluxo de $CO_2$ de volta para a atmosfera.

Uma segunda abordagem para limitar o aumento do $CO_2$ atmosférico, ao mesmo tempo em que também se considera a necessidade de substituir combustíveis fósseis em esgotamento, é usar biomassa renovável como fonte de etanol para substituir combustíveis fósseis em motores de combustão interna. Isso reduz o movimento *unidirecional* de carbono dos combustíveis fósseis para o *pool* atmosférico de $CO_2$, substituindo-o pelo fluxo *cíclico* de $CO_2$ do etanol para $CO_2$ e de volta para a biomassa. Quando milho, trigo ou *switchgrass* (*Panicum virgatum*) são fermentados a etanol para combustível, todo o aumento em produção de biomas-

O malato ou o aspartato formados nas células do mesófilo passam então para as células vizinhas da bainha vascular através dos plasmodesmos, canais forrados de proteínas, que conectam duas células vegetais e que proporcionam uma via para o movimento de metabólitos e mesmo de pequenas proteínas entre as células. Nas células da bainha vascular, o malato é oxidado e descarboxilado para gerar piruvato e $CO_2$ pela ação da **enzima málica**, reduzindo $NADP^+$. Em plantas que usam o aspartato como carreador de $CO_2$, o aspartato que chega nas células da bainha vascular é transaminado para formar oxaloacetato, sendo, a seguir, reduzido a malato; então, o $CO_2$ é liberado pela enzima málica ou pela PEP-carboxicinase. Conforme mostram os experimentos de marcação, o $CO_2$ liberado nas células da bainha vascular é a mesma molécula de $CO_2$ originalmente fixada no oxaloacetato nas células do mesófilo. Este $CO_2$ é agora novamente fixado, desta vez pela rubisco, em uma reação que é exatamente a mesma que ocorre em plantas $C_3$: incorporação de $CO_2$ no C-1 do 3-fosfoglicerato.

O piruvato formado pela descarboxilação do malato nas células da bainha vascular é transferido de volta às célu-

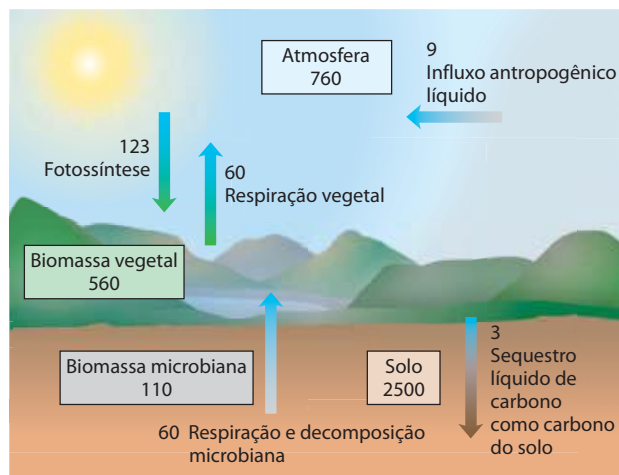



**FIGURA Q-2** O ciclo de carbono terrestre. Estoques de carbono (quadros) são mostrados como gigatoneladas (GT), e os fluxos (setas) são mostrados em GT por ano. A biomassa vegetal é desprezível aqui – menos do que 0,5 GT.

sa alcançado por uma fotossíntese mais eficiente deve resultar em um decréscimo correspondente no uso de combustíveis fósseis.

Finalmente, a engenharia de culturas alimentícias visando produzir mais alimento por hectare de terra, ou por hora de trabalho, poderia melhorar a nutrição humana em todo o mundo.

Em princípio, essas metas podem ser alcançadas desenvolvendo-se uma rubisco que não catalisasse também a reação desperdiçadora com o $O_2$ ou aumentando o número de renovação para a rubisco ou aumentando o nível da rubisco e de outras enzimas na via de fixação do carbono. A rubisco, conforme já dito, é uma enzima de ineficiência incomum, com um número de renovação de 3 $s^{-1}$ a 25°C; a maioria das enzimas têm ordens de números de renovação de magnitude maiores. Ela também catalisa a reação desperdiçadora com o oxigênio, a qual reduz ainda mais sua eficiência em fixar $CO_2$ e produzir biomassa. Se a rubisco pudesse ser geneticamente modificada para renovar-se mais rapidamente ou para ser mais seletiva para o $CO_2$ em relação ao $O_2$, o efeito seria de maior produção fotossintética de biomassa e, portanto, maior sequestro de $CO_2$, produção de mais combustível não fóssil e melhor nutrição?

Foi observado no Capítulo 15 que a visão tradicional de vias metabólicas sustentava que uma etapa em qualquer via era a mais lenta e, portanto, o fator limitante no fluxo de material através da via. Entretanto, esforços heroicos na engenharia celular ou de organismos têm muitas vezes gerado resultados desanimadores; organismos modificados para produzir mais da enzima "limitante" em uma via em geral mostraram pouca ou nenhuma mudança no fluxo através daquela via. O ciclo de Calvin é um caso elucidativo nesse ponto. Aumentar a quantidade de rubisco em células vegetais por meio de engenharia genética tem pouco ou nenhum efeito na taxa de conversão de $CO_2$ em carboidrato. De forma semelhante, mudanças nos níveis de enzimas conhecidas por serem reguladas pela luz e, portanto, suspeitas de desempenharem papeis centrais na regulação da via (frutose 1,6-bifosfatase, 3-fosfoglicerato-cinase e gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) também levaram a pouca ou nenhuma melhoria significativa na taxa fotossintética. Porém, níveis alterados de sedoeptulose 1,7-bifosfatase, não considerada uma enzima regulatória, têm um impacto significativo na fotossíntese. A análise do controle metabólico (Seção 15.2) sugere que esse resultado não é inesperado; no organismo vivo, as vias podem ser limitadas por mais de uma etapa, uma vez que toda mudança em uma etapa resulta em mudanças compensatórias em outras etapas. Uma determinação cuidadosa do coeficiente de controle de fluxo (ver Quadro 15–1) ajuda a apontar quais enzimas em uma via que devem ser o alvo da engenharia genética. Claramente, engenheiros genéticos e analistas de controle metabólico precisarão trabalhar juntos em problemas como este!

las do mesófilo, onde é convertido em PEP por uma reação enzimática incomum, catalisada pela **piruvato-fosfato-dicinase** (Figura 20-23b). A enzima é denominada dicinase porque duas moléculas diferentes são simultaneamente fosforiladas por uma molécula de ATP: piruvato é fosforilado, produzindo PEP e fosfato é fosforilado, originando pirofosfato. O pirofosfato é posteriormente hidrolisado em fosfato, de forma que dois grupos fosfato de alta energia do ATP são usados na regeneração do PEP. O PEP está agora pronto para receber uma outra molécula de $CO_2$ na célula do mesófilo.

A PEP-carboxilase nas células do mesófilo tem alta afinidade por $HCO_3^-$ (que é favorecido em relação ao $CO_2$ em solução aquosa) e pode fixar $CO_2$ de maneira mais eficiente do que a rubisco. Ao contrário da rubisco, ela não usa $O_2$ como substrato alternativo, de forma que não há competição entre $CO_2$ e $O_2$. A reação da PEP-carboxilase serve, portanto, para fixar e concentrar $CO_2$ na forma de malato. A liberação de $CO_2$ do malato nas células da bainha vascular gera uma concentração local suficientemente alta de $CO_2$ para que a rubisco funcione perto de sua velocidade máxima e para a supressão da atividade de oxigenase da enzima.

Uma vez que o $CO_2$ é fixado no 3-fosfoglicerato nas células da bainha vascular, as outras reações do ciclo de Calvin acontecem exatamente da maneira descrita anteriormente. Assim, nas plantas $C_4$, as células do mesófilo realizam a assimilação de $CO_2$ pela via $C_4$, e as células da bainha vascular sintetizam amido e sacarose pela via $C_3$.

Três enzimas da via $C_4$ são reguladas pela luz, tornando-se mais ativas durante o dia. A malato-desidrogenase é ativada pelo mecanismo de redução dependente de tiorredoxina, mostrado na Figura 20-19; a PEP-carboxilase é ativada pela fosforilação de um resíduo de Ser; e a piruvato-fosfato-dicinase é ativada por desfosforilação. Nos últimos dois casos, os detalhes de como a luz afeta a fosforilação ou a desfosforilação não são conhecidos.

A via de assimilação de $CO_2$ tem um custo energético maior em plantas $C_4$ do que em plantas $C_3$. Para cada molécula de $CO_2$ assimilada na via $C_4$, uma molécula de PEP precisa ser regenerada à custa de duas ligações fosfoanidrido do ATP. Assim, as plantas $C_4$ precisam de cinco moléculas de ATP para assimilar uma molécula de $CO_2$, enquanto as plantas $C_3$ precisam de apenas três (nove por triose-fosfato). À medida que a temperatura aumenta (e a afinidade da rubisco pelo $CO_2$ diminui, como observado anteriormente), é atingido um ponto (em cerca de 28 a 30°C) no qual o ganho em eficiência oriundo da eliminação da fotorrespiração mais do que compensa este custo energético. As plantas $C_4$ (p. ex., o capim-colchão) superam a maioria das plantas $C_3$ durante o verão, como qualquer jardineiro experiente pode atestar.

### Em plantas CAM, a captura de $CO_2$ e a ação da rubisco estão separadas temporalmente

Plantas suculentas como os cactus e o abacaxi, nativas de ambientes muito quentes e muito secos, têm outra variação da fixação fotossintética de $CO_2$, a qual reduz a perda de vapor de água através dos poros (estômatos) por onde o $CO_2$ e o $O_2$ precisam ingressar no tecido vegetal. Em vez de separarem no espaço o aprisionamento inicial do $CO_2$ e sua fixação pela rubisco (como fazem as plantas $C_4$), elas separam esses dois eventos ao longo do tempo. À noite, quando o ar está mais fresco e mais úmido, os estômatos se abrem para permitir a entrada de $CO_2$, então fixado na forma de oxaloacetato pela PEP-carboxilase. O oxaloacetato é reduzido a malato e armazenado em vacúolos para proteger as enzimas citosólicas e dos plastídeos do pH baixo produzido pela dissociação do ácido málico. Durante o dia, os estômatos se fecham, impedindo a perda de água que resultaria das altas temperaturas diurnas, e o $CO_2$ aprisionado ao longo da noite no malato é liberado como $CO_2$ pela enzima málica ligada ao NADP. Esse $CO_2$ é agora assimilado pela ação da rubisco e das enzimas do ciclo de Calvin. Como esse método de fixação de $CO_2$ foi inicialmente descoberto em plantas do tipo dedo-de-moça, plantas perenes da família *Crassulaceae*, ele é chamado de metabolismo ácido das crassuláceas (de ***c****rassulacean* ***a****cid* ***m****etabolism*) e as plantas são chamadas de **plantas CAM**.

### RESUMO 20.2 Fotorrespiração e as vias $C_4$ e CAM

- Quando a rubisco usa o $O_2$ em vez do $CO_2$ como substrato, o 2-fosfoglicolato então formado é descartado em uma via dependente de oxigênio. O resultado é o consumo aumentado de $O_2$ – fotorrespiração ou, mais precisamente, o ciclo oxidativo fotossintético do carbono ou ciclo $C_2$. O 2-fosfoglicolato é convertido em glioxilato, a seguir em glicina e então em serina, em uma via que envolve enzimas no estroma do cloroplasto, no peroxissomo e na mitocôndria.
- Em plantas $C_4$, a via de assimilação de carbono minimiza a fotorrespiração: o $CO_2$ é primeiro fixado nas células do mesófilo em um composto de quatro carbonos, que passa para as células da bainha vascular e libera $CO_2$ em altas concentrações. O $CO_2$ liberado é fixado pela rubisco, e as demais reações do ciclo de Calvin ocorrem como nas plantas $C_3$.
- Em plantas CAM, o $CO_2$ é fixado em malato no escuro e estocado nos vacúolos até o período diurno, quando os estômatos estão fechados (minimizando a perda de água) e o malato serve como fonte de $CO_2$ para a rubisco.

## 20.3 Biossíntese de amido e sacarose

Durante a fotossíntese ativa sob luz intensa, a folha de um vegetal produz mais carboidratos (na forma de trioses-fosfato) do que precisa para gerar energia ou sintetizar precursores. O excesso é convertido a sacarose e transportado a outras partes da planta para ser utilizado como combustível ou armazenado. Na maioria das plantas, o amido é a principal forma de estocagem, mas em algumas poucas plantas, como a beterraba açucareira e a cana-de-açúcar, a sacarose é a principal forma de estocagem. As sínteses de sacarose e de amido ocorrem em diferentes compartimentos celulares (citosol e plastídeos, respectivamente), e esses processos estão coordenados por uma variedade de mecanismos de regulação, que respondem a mudanças no nível de luminosidade e na velocidade da fotossíntese. A síntese de sacarose e de amido é importante para a planta, mas também para humanos: o amido fornece mais do que 80% das calorias da dieta humana em todo o mundo.

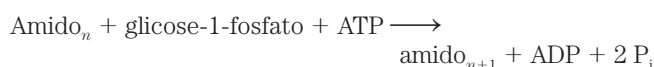
### A ADP-glicose é o substrato para a síntese de amido em plastídeos vegetais e para a síntese de glicogênio em bactérias

O amido, assim como o glicogênio, é um polímero de D-glicose em ligação ($\alpha 1 \rightarrow 4$) de alto peso molecular. Para armazenamento temporário, ele é sintetizado nos cloroplastos como um dos produtos finais estáveis da fotossíntese; para estocagem de longo prazo, ele é sintetizado nos amiloplastos das partes não fotossintéticas das plantas – sementes, raízes e tubérculos (caules subterrâneos).

O mecanismo de ativação da glicose na síntese do amido é semelhante àquele da síntese do glicogênio. Um **açúcar-nucleotídeo** ativado, nesse caso a **ADP-glicose**, é forma-

do pela condensação de glicose-1-fosfato com ATP em uma reação essencialmente irreversível pela presença de pirofosfatase inorgânica nos plastídeos (Figura 15-31). A **amido-sintase** então transfere resíduos de glicose da ADP-glicose para molécula preexistentes de amido. As unidades monoméricas são quase que certamente adicionadas à extremidade não redutora do polímero em crescimento, da forma como o fazem na síntese de glicogênio (ver Figura 15-32).

A amilose do amido não é ramificada, mas a amilopectina tem numerosas ramificações formadas por ligações ($\alpha$1→6) (ver Figura 7-13). Os cloroplastos contêm uma enzima ramificadora, semelhante à enzima de ramificação do glicogênio (ver Figura 15-33), que introduz as ramificações ($\alpha$1→6) da amilopectina. Levando em consideração a hidrólise do $PP_i$ produzido durante a síntese de ADP-glicose pela pirofosfatase inorgânica, a reação global para a formação do amido a partir da glicose-1-fosfato é

$$\text{Amido}_n + \text{glicose-1-fosfato} + \text{ATP} \longrightarrow \text{amido}_{n+1} + \text{ADP} + 2\,\text{P}_i$$

$$\Delta G'^\circ = -50 \text{ kJ/mol}$$

A síntese de amido é regulada no nível da formação da ADP-glicose, conforme discutido a seguir.

Muitos tipos de bactérias armazenam carboidratos na forma de glicogênio (essencialmente, amido altamente ramificado), sintetizado em uma reação análoga àquela catalisada pela glicogênio-sintase em animais. As bactérias, como os plastídeos vegetais, usam ADP-glicose como a forma ativada de glicose, enquanto as células animais usam UDP-glicose. Novamente, a semelhança entre o metabolismo de plastídeos e bactérias é consistente com a hipótese endossimbiótica para a origem das organelas (p. 36).

## A UDP-glicose é o substrato para a síntese de sacarose no citosol de células das folhas

A maior parte das trioses-fosfato geradas pela fixação do $CO_2$ em plantas é convertida em sacarose (**Figura 20-24**) ou amido. No curso da evolução, a sacarose deve ter sido selecionada como a forma de transporte de carbono, devido a sua ligação pouco comum entre o C-1 anômero da glicose e o C-2 anômero da frutose. Essa ligação não é hidrolisada por amilases ou por outras enzimas comuns que hidrolisam carboidratos, e a indisponibilidade de carbonos anômeros impede a sacarose de reagir de modo não enzimático (como faz a glicose) com aminoácidos e proteínas.

A sacarose é sintetizada no citosol, a partir da di-hidroxiacetona-fosfato e do gliceraldeído-3-fosfato exportados do cloroplasto. Depois da condensação de duas trioses-fosfato para formar frutose-1,6-bifosfato (catalisada pela aldolase), a hidrólise pela frutose-1,6-bifosfatase gera frutose 6-fosfato. A **sacarose-6-fosfato-sintase** catalisa então a reação da frutose-6-fosfato com a **UDP-glicose** para formar **sacarose-6-fosfato** (Figura 20-24). Finalmente, a **sacarose-6-fosfato-fosfatase** remove o grupo fosfato, tornando a sacarose disponível para a exportação a outros tecidos. A reação catalisada pela sacarose-6-fosfato-sintase é um processo de baixa energia ($\Delta G'^\circ$ = –5,7 kJ/mol), mas a hidrólise da sacarose-6-fosfato a sacarose é suficientemente exergônica ($\Delta G'^\circ$ = –16,5 kJ/mol) para tornar a síntese global da sacarose essencialmente irreversível. A síntese de sacarose é regulada e intimamente coordenada com a síntese de amido, conforme será visto.

UDP-glicose + Frutose-6-fosfato → (Sacarose-6-fosfato-sintase; UDP) → Sacarose-6-fosfato → (Sacarose-6-fosfato-fosfatase; $P_i$) → Sacarose

**FIGURA 20-24 Síntese da sacarose.** A sacarose é sintetizada a partir da UDP-glicose e da frutose-6-fosfato, sintetizadas a partir das trioses-fosfato no citosol da célula vegetal por vias mostradas nas Figuras 15-31 e 20-9. A sacarose-6-fosfato-sintase da maioria das espécies vegetais é alostericamente regulada por glicose-6-fosfato e $P_i$.

Uma diferença marcante entre as células vegetais e animais é a ausência no citosol da célula vegetal da enzima pirofosfatase inorgânica, que catalisa a reação

$$\text{PP}_i + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2\,\text{P}_i \qquad \Delta G'^\circ = -19{,}2 \text{ kJ/mol}$$

Para muitas reações biossintéticas que liberam $PP_i$, a atividade da pirofosfatase torna o processo mais favorável energeticamente, tendendo a tornar essas reações irreversíveis. Nas plantas, essa enzima está presente nos plastídeos, mas ausente no citosol. Como resultado, o citosol das células foliares contêm uma concentração substancial de $PP_i$ – o suficiente (~0,3 mM) para tornar reações como a catalisada pela UDP-glicose-pirofosforilase (ver Figura 15-31) facil-

mente reversíveis. Lembre-se do Capítulo 14 (p. 550) que a isoenzima citosólica da fosfofruto-cinase em plantas usa $PP_i$, e não ATP, como doador de fosforil.

## A conversão de trioses-fosfato em sacarose e amido é firmemente regulada

As trioses-fosfato produzidas pelo ciclo de Calvin sob luz solar intensa, conforme salientado, podem ser temporariamente estocadas no cloroplasto como amido ou convertidas em sacarose e exportadas para partes não fotossintéticas das plantas, ou ambos. O balanço entre os dois processos é fortemente regulado e ambos precisam ser coordenados com a velocidade de fixação de carbono. Cinco sextos das trioses-fosfato formadas no ciclo de Calvin precisam ser reciclados, regenerando ribulose-1,5-bifosfato (Figura 20-14). Se mais de um sexto das trioses-fosfato é retirado do ciclo para fazer sacarose e amido, o ciclo terá sua velocidade reduzida ou irá parar completamente. No entanto, a conversão *insuficiente* de trioses-fosfato em amido ou sacarose aprisionaria fosfato, deixando o cloroplasto deficiente em $P_i$, o qual também é essencial para a operação do ciclo de Calvin.

O fluxo de trioses-fosfato para sacarose é regulado pela atividade da frutose-1,6-bifosfatase (FBPase-1) e a enzima que efetivamente reverte sua ação, a fosfofrutocinase dependente de $PP_i$ (PP-PFK-1; p. 550). Portanto, essas enzimas são pontos críticos na determinação do destino das trioses-fosfato produzidas pela fotossíntese. Ambas as enzimas são reguladas pela **frutose-2,6-bifosfato** (**F26BP**), que inibe a FBPase-1 e estimula a PP-PFK-1. Em plantas vasculares, a concentração de F26BP varia inversamente com a taxa de fotossíntese (**Figura 20-25**). A fosfofrutocinase-2, responsável pela síntese de F26BP, é inibida por di-hidroxiacetona-fosfato ou 3-fosfoglicerato, sendo estimulada por frutose-6-fosfato e $P_i$. Durante a fotossíntese ativa, a di-hidroxiacetona-fosfato é produzida e $P_i$ é consumido, resultando na inibição da PFK-2 e em concentrações reduzidas de F26BP. Isso favorece um fluxo maior de trioses-fosfato para a formação de frutose-6-fosfato e a síntese de sacarose. Com esse sistema de regulação, a síntese de sacarose ocorre quando o nível de trioses-fosfato produzido pelo ciclo de Calvin excede aquele necessário para manter a operação do ciclo.

A síntese de sacarose também é regulada no nível de sacarose-6-fosfato-sintase, que é ativada alostericamente por glicose-6-fosfato e inibida por $P_i$. Essa enzima é ainda regulada por fosforilação e desfosforilação; uma proteína-cinase fosforila a enzima em um resíduo específico de Ser, tornando-a menos ativa, e uma fosfatase reverte esta inativação removendo o fosfato (**Figura 20-26**). A inibição da cinase por glicose-6-fosfato e da fosfatase por $P_i$ aumenta os efeitos desses dois compostos na síntese de sacarose. Quando hexoses-fosfato são abundantes, a sacarose-6-fosfato sintase é ativada por glicose-6-fosfato; quando $P_i$ está elevado (como ocorre quando a fotossíntese é lenta), a síntese de sacarose é diminuída. Durante a fotossíntese ativa, trioses fosfato são convertidas em frutose-6-fosfato, que é rapidamente equilibrada com glicose-6-fosfato pela

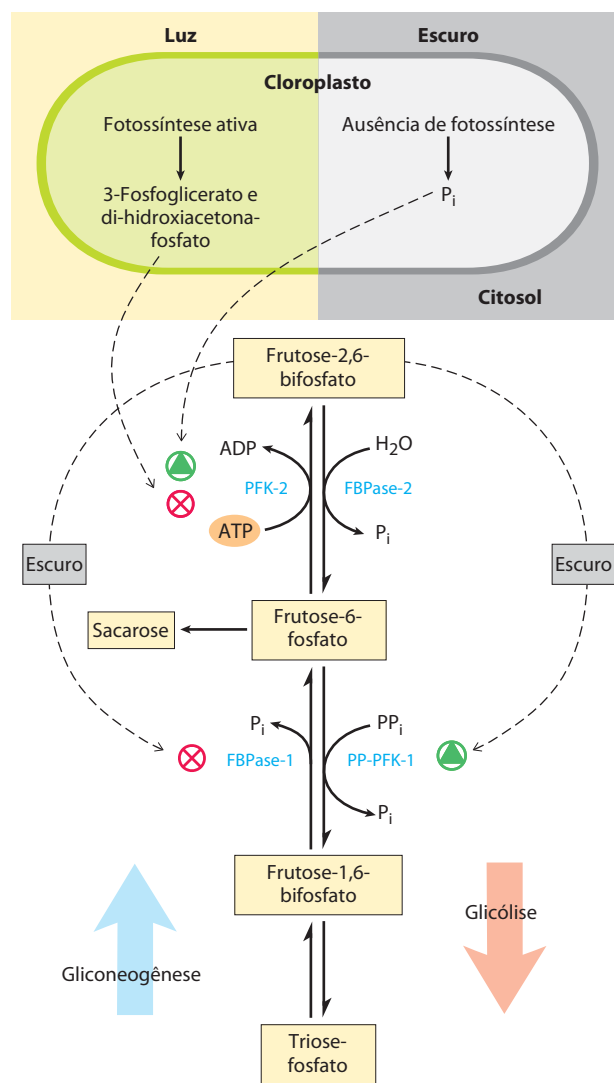



**FIGURA 20-25 Frutose-2,6-bifosfato na regulação da síntese de sacarose.** A concentração do efetor alostérico frutose-2,6-bifosfato em células vegetais é regulada pelos produtos da assimilação fotossintética de carbono e por $P_i$. Di-hidroxiacetona-fosfato e 3-fosfoglicerato produzidos pela assimilação de $CO_2$ inibem a fosfofrutocinase-2 (PFK-2), a enzima que sintetiza o efetor; o $P_i$ estimula a PFK-2. A concentração de frutose-2,6-bifosfato é, portanto, inversamente proporcional à velocidade da fotossíntese. No escuro, a concentração de frutose-2,6-bifosfato aumenta e estimula a enzima glicolítica fosfofrutocinase-1 dependente de $PP_i$ (PP-PFK-1), enquanto inibe a enzima gliconeogênica frutose-1,6-bifosfatase (FBPase-1). Quando a fotossíntese está ativa (na luz), a concentração do regulador diminui e a síntese de frutose-6-fosfato e de sacarose é favorecida.

fosfo-hexose isomerase. Como o equilíbrio dessa reação favorece bastante a formação da glicose-6-fosfato, assim que a frutose-6-fosfato se acumula o nível de glicose-6-fosfato aumenta e a síntese de sacarose é estimulada.

A enzima-chave da regulação na síntese de amido é a **ADP-glicose-pirofosforilase** (**Figura 20-27**); ela é ativada por 3-fosfoglicerato (que se acumula durante a fotossíntese ativa) e inibida por $P_i$ (que se acumula quando a condensação de ADP e $P_i$ promovida pela luz é reduzida).

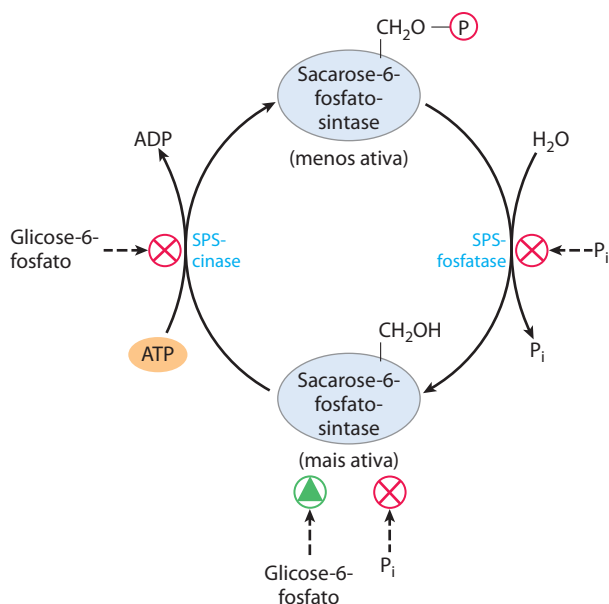



**FIGURA 20-26 Regulação da sacarose-fosfato-sintase por fosforilação.** Uma proteína-cinase (SPS-cinase) específica para a sacarose fosfato--sintase (SPS) fosforila um resíduo de Ser na SPS, inativando-a; uma fosfatase específica (SPS-fosfatase) reverte esta inibição. A cinase é alostericamente inibida por glicose-6-fosfato, que também ativa a SPS alostericamente. A fosfatase é inibida por $P_i$, que também inibe a SPS diretamente. Assim, quando a concentração de glicose-6-fosfato é alta como resultado da fotossíntese ativa, SPS é ativada e produz sacarose-fosfato. Uma alta concentração de $P_i$, que ocorre quando a conversão fotossintética de ADP em ATP é lenta, inibe a síntese de sacarose-fosfato.

**FIGURA 20-27 Regulação da ADP-glicose-fosforilase por 3-fosfoglicerato e $P_i$.** Esta enzima, que produz o precursor para a síntese do amido, é o passo limitante da velocidade de produção do amido. A enzima é alostericamente estimulada por 3-fosfoglicerato (3-PGA) e inibida por $P_i$; de fato, a razão [3-PGA]/[$P_i$], que se eleva com o aumento na velocidade da fotossíntese, controla a síntese de amido nesta etapa.

Quando a síntese de sacarose diminui, o 3-fosfoglicerato formado pela fixação do $CO_2$ é acumulado, ativando essa enzima e estimulando a síntese de amido.

## RESUMO 20.3 Biossíntese de amido e sacarose

- A amido-sintase nos cloroplastos e amiloplastos catalisa a adição de resíduos individuais de glicose, doados por ADP-glicose, provavelmente à extremidade não redutora. As ramificações na amilopectina são introduzidas por uma segunda enzima.
- A sacarose é sintetizada no citosol em duas etapas, a partir de UDP-glicose e frutose-1-fosfato.
- A partição das trioses-fosfato entre a síntese de sacarose e a síntese de amido é regulada pela frutose-2,6--bifosfato (F26BP), um efetor alostérico das enzimas que determinam o nível de frutose-6-fosfato. A concentração de F26BP varia inversamente com a velocidade da fotossíntese, e a F26BP inibe a síntese de frutose-6--fosfato, o precursor da sacarose.

# 20.4 Síntese de polissacarídeos da parede celular: celulose vegetal e peptideoglicano bacteriano

A celulose é o principal constituinte das paredes celulares das plantas, proporcionando resistência e rigidez e impedindo o inchamento celular e a ruptura da membrana plasmática que podem ocorrer quando as condições osmóticas favorecem a entrada de água na célula. A cada ano, mundialmente, as plantas sintetizam mais de $10^{11}$ toneladas de celulose, fazendo desse polímero simples um dos compostos mais abundantes da biosfera. A estrutura da celulose é simples: polímeros lineares de milhares de unidades de D-glicose com ligações ($\beta1\rightarrow4$), agrupados em feixes de cerca de 36 cadeias, que se agregam lado a lado para formar uma microfibrila (**Figura 20-28**).

A biossíntese de celulose é menos conhecida do que a do glicogênio ou do amido. Como componente principal da parede celular vegetal, a celulose precisa ser sintetizada a partir de precursores intracelulares, mas suas cadeias devem ser depositadas e agrupadas fora da membrana plasmática. A maquinaria enzimática para a iniciação, o alongamento e a exportação das cadeias de celulose é mais complicada do que aquela necessária para sintetizar amido ou glicogênio (não exportados). As bactérias enfrentam um conjunto semelhante de problemas quando sintetizam os complexos polissacarídeos que constituem suas paredes celulares e utilizam alguns dos mesmos mecanismos para resolver esses problemas.

## A celulose é sintetizada por estruturas supramoleculares na membrana plasmática

A complexa maquinaria enzimática que monta as cadeias de celulose abrange a membrana plasmática, com uma parte posicionada para ligar o substrato, a UDP-glicose, no citosol, e outra parte se estendendo para fora, responsável pelo alongamento e a cristalização das moléculas de celulose no espaço extracelular. A microscopia eletrônica de criofratura mostra que esses **complexos terminais**, também chamados de **rosetas**, são compostos de seis partículas grandes, arranjadas em um hexágono regular com um diâmetro de cerca de 30 nm (**Figura 20-29**). Diversas proteínas, incluindo a subunidade catalítica da **celulose--sintase**, constituem o complexo terminal. A maior parte

**FIGURA 20-28 Estrutura da celulose.** A parede celular vegetal é formada, em parte, por moléculas de celulose, arranjadas lado a lado para formar estruturas paracristalinas – microfibrilas de celulose. Muitas microfibrilas se combinam para formar uma fibra de celulose, visualizada em microscopia eletrônica de varredura como uma estrutura de 5 a 12 nm de diâmetro, depositada na superfície celular em diversas camadas distinguíveis pelas diferentes orientações de suas fibras.

do progresso recente no entendimento da síntese de celulose advém de estudos genéticos e genético-moleculares da planta *Arabidopsis thaliana*, especialmente apropriada à dissecação genética e cujo genoma foi sequenciado. A família de genes que codifica esta atividade de síntese de celulose foi clonada e mostrou codificar proteínas com oito segmentos transmembrânicos e um domínio central no lado citosólico da membrana plasmática, que inclui sequências que podem ser encontradas em uma glicosiltransferase (Figura 20-29).

Em um modelo de trabalho da síntese de celulose, as cadeias de celulose são iniciadas pela formação de um intermediário ligado a um lipídeo, diferente de qualquer elemento envolvido na síntese de amido ou glicogênio. Conforme mostrado na etapa ❶ da Figura 20-29 , a glicose é transferida da UDP-glicose para um lipídeo de membrana, provavelmente o esterol vegetal sitosterol, sobre a face interna da membrana plasmática. Aqui, a celulose-sintase intracelular adiciona vários outros resíduos de glicose ao primeiro, em ligações ($\beta$1→4), formando um oligossacarídeo curto ligado ao sitosterol (sitosterol-dextrina). A seguir, a sitosterol-dextrina inteira é rebatida para a face externa da

**FIGURA 20-29 Um modelo proposto para a síntese de celulose em uma planta vascular.** Este esquema é derivado de uma combinação de estudos genéticos e bioquímicos da *Arabidopsis thaliana* e de outras plantas vasculares.

membrana plasmática, onde ela agora se associa com uma outra forma de celulose-sintase.

A UDP-glicose usada para a síntese de celulose (etapa ❷) é gerada a partir da sacarose produzida durante a fotossíntese, pela reação catalisada pela sacarose-sintase (assim denominada devido à reação reversa):

$$\text{Sacarose} + \text{UDP} \longrightarrow \text{UDP-glicose} + \text{frutose}$$

A celulose-sintase se estende ao longo da membrana plasmática e usa UDP-glicose citosólica como precursor para a síntese extracelular de celulose. Uma forma de sacarose-sintase ligada à membrana forma um complexo com a celulose-sintase, fornecendo UDP-glicose a partir da sacarose diretamente para a síntese da parede celular.

Na etapa ❸, uma segunda forma de celulose-sintase alonga o polímero até 500 a 15.000 unidades de glicose, liberando-o para a superfície externa da célula. A ação da enzima é continuada: uma molécula de enzima adiciona muitas unidades de glicose antes de liberar a cadeia de celulose em crescimento. O sentido do crescimento da cadeia (se a adição ocorre na extremidade redutora ou não redutora) ainda não foi definitivamente estabelecido.

Cada um dos seis glóbulos da roseta consiste em múltiplas subunidades proteicas que juntas sintetizam seis cadeias de celulose. O grande complexo enzimático que catalisa esse processo (etapa ❹) na verdade se move ao longo da membrana plasmática, seguindo o curso dos microtúbulos no córtex, a camada de citoplasma logo abaixo da membrana. Como esses microtúbulos jazem perpendiculares ao eixo de crescimento da planta, as microfibrilas de celulose são depositadas transversalmente ao eixo de crescimento. Acredita-se que o movimento dos complexos de celulose-sintase seja promovido pela energia liberada na reação de polimerização e não por um motor molecular como a cinesina.

A celulose pronta encontra-se na forma de microfibrilas cristalinas (Figura 20-28), cada uma composta por 36 cadeias de celulose separadas, colocadas lado a lado, todas com a mesma orientação (paralelas) das extremidades não redutoras e redutoras. Parece provável que os 36 polímeros separados, sintetizados em uma roseta, cheguem juntos à face externa da célula, já alinhados e (etapa ❺) prontos para se cristalizarem como uma microfibrila da parede celular. Quando os 36 polímeros atingem um comprimento crítico, sua síntese é encerrada por um mecanismo desconhecido; segue-se a cristalização na forma de uma microfibrila.

No precursor ativado da celulose (UDP-glicose), a glicose apresenta ligação $\alpha$ com o nucleotídeo, mas no produto (celulose), os resíduos de glicose estão unidos por ligação ($\beta$1→4), de forma que há uma inversão de configuração no carbono anômero (C-1) à medida que a ligação glicosídica se forma. Imagina-se que as glicosiltransferases que invertem a configuração usam um mecanismo de deslocamento único, com ataque nucleofílico pela espécie aceptora no carbono anômero do açúcar doador (UDP-glicose).

Certas bactérias (*Acetobacter*, *Agrobacteria*, *Rhizobia* e *Sarcina*) e muitos eucariotos simples também realizam a síntese de celulose, aparentemente por um mecanismo semelhante ao das plantas. Se as bactérias usam um lipídeo de membrana para iniciar novas cadeias, esse não pode ser um esterol – as bactérias não contêm esteróis.

## Oligossacarídeos ligados a lipídeos são precursores na síntese da parede celular bacteriana

Da mesma maneira que as plantas, muitas bactérias têm paredes extracelulares espessas e rígidas que as protegem da lise osmótica. O **peptideoglicano** que fornece aos envelopes bacterianos sua força e rigidez é um copolímero linear de *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) e ácido *N*-acetilmurâmico (Mur2Ac) alternados, unidos por ligações glicosídicas ($\beta$1→4) e com ligações cruzadas com peptídeos curtos ligados ao Mur2Ac (**Figura 20-30**). Durante a montagem do esqueleto do polissacarídeo dessa macromolécula com-

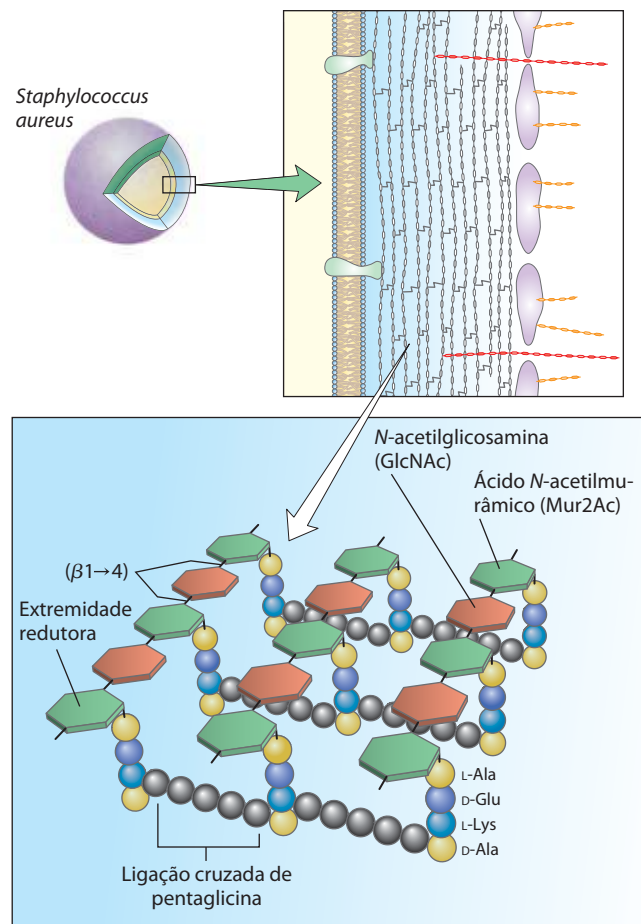



**FIGURA 20-30 Estrutura do peptideoglicano.** Este é o peptideoglicano da parede celular de *Staphylococcus aureus*, bactéria gram-positiva. Os peptídeos (cordões de esferas coloridas) ligam-se covalentemente a resíduos de ácido *N*-acetilmurâmico em cadeias polissacarídicas vizinhas. Observe a mistura de L- e D-aminoácidos nos peptídeos. Bactérias gram-positivas, como *S. aureus*, têm uma cadeia de pentaglicina efetuando uma ligação cruzada. Bactérias gram-negativas, como a *E. coli*, não têm a pentaglicina; em vez disto, o resíduo terminal D-Ala de um tetrapeptídeo é diretamente ligado a um tetrapeptídeo vizinho por meio da L-Lys ou de um aminoácido do tipo lisina, o ácido diaminopimélico. A ligação peptídica do glutamato é pouco comum aqui; ela envolve o grupo carboxil da cadeia lateral do glutamato.

plexa, ambos GlnNAc e Mur2Ac são ativados por ligação a um nucleotídeo da uridina em seus carbonos anômeros. Primeiro, GlcNAc-1-fosfato condensa-se com UTP para formar UDP-GlcNAc (**Figura 20-31**, etapa ❶), que reage com fosfoenolpiruvato para formar UDP-Mur2Ac (etapa ❷); cinco aminoácidos são então adicionados (etapa ❸). A porção Mur2Ac-pentapeptídeo é transferida do nucleotídeo da uridina para o lipídeo de membrana dolicol, álcool isoprenoide de cadeia longa (ver Figura 10-22f) (etapa ❹), e um resíduo de GlcNAc é doado pela UDP-GlcNAc (etapa ❺). Em muitas bactérias, cinco glicinas são adicionadas em ligação peptídica ao grupo amino do resíduo de Lys do pentapeptídeo (etapa ❻). Finalmente, esse dissacarídeo decapeptídeo é adicionado à extremidade não redutora de uma molécula existente de peptideoglicano (etapa ❼). Efetuam-se ligações peptídicas cruzadas entre cadeias de oligopeptídeos, unindo cadeias adjacentes de polissacarídeos (etapa ❽), contribuindo para uma parede macromolecular enorme e forte ao redor da célula bacteriana. Muitos dos antibióticos mais efetivos em uso atualmente agem inibindo reações de síntese do peptideoglicano.

Muitos outros oligossacarídeos e polissacarídeos são sintetizados por vias similares, onde açúcares são ativados para as reações subsequentes por ligação a nucleotídeos. Na glicolisação de proteínas, por exemplo (ver Figura 27-39), os precursores das porções carboidrato incluem açúcares ligados a nucleotídeos e oligossacarídeos ligados a lipídeos.

## RESUMO 20.4 Síntese de polissacarídeos da parede celular: celulose vegetal e peptideoglicano bacteriano

- A síntese de celulose ocorre em complexos terminais (rosetas) na membrana plasmática. Cada cadeia de celulose começa como uma sitosterol-dextrina formada dentro da célula. Ela é então rebatida para o lado de

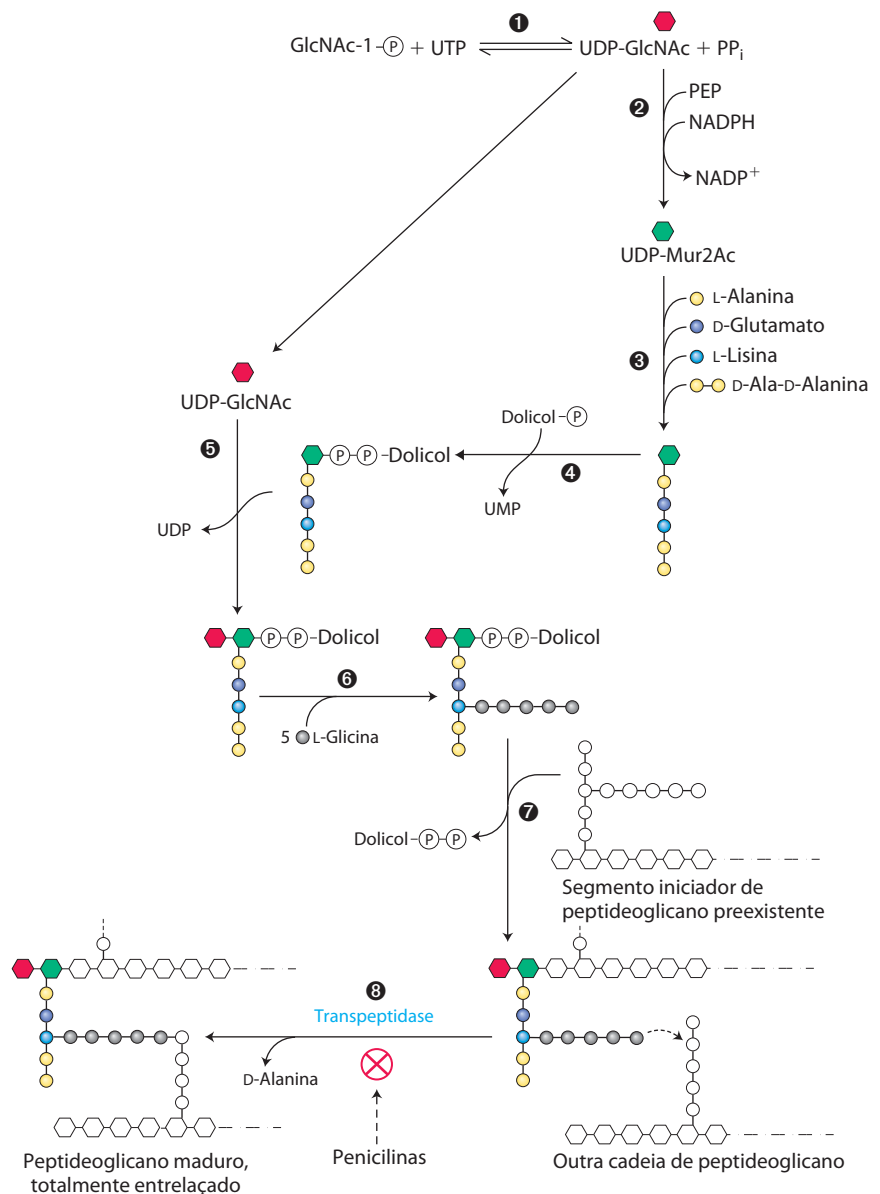



**FIGURA 20-31 Síntese do peptideoglicano bacteriano.** Nas etapas iniciais desta via (❶ a ❹), a *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) e o ácido *N*-acetilmurâmico (Mur2Ac) são ativados por ligação de seus carbonos anômeros a um nucleotídeo da uridina (UDP) e, no caso do Mur2Ac, a um álcool isoprenoide de cadeia longa (dolicol), por meio de uma ligação fosfodiéster. Estes grupos ativadores participam da formação das ligações glicosídicas; eles servem como excelentes promotores da ligação que depois se desligam. Depois das etapas ❺ e ❻ e da reunião de um dissacarídeo com uma cadeia lateral peptídica (10 resíduos de aminoácidos), ❼ este precursor é transferido à extremidade não redutora de uma cadeia de peptideoglicano preexistente, que serve como iniciador da reação de polimerização. Finalmente ❽, em uma reação de transpeptidação entre as cadeias laterais peptídicas em duas moléculas de peptideoglicanos diferentes, um resíduo de Gly na extremidade de uma cadeia desloca uma D-Ala terminal na outra cadeia, formando uma ligação cruzada. Esta reação de transpeptidação é inibida por penicilinas, que matam as bactérias por enfraquecerem suas paredes celulares (ver Figura 6-30).

fora, onde a porção oligossacarídica é transferida para a celulose-sintase na roseta, sendo então alongada. Cada roseta produz simultaneamente e em paralelo 36 cadeias de celulose separadas. As cadeias cristalizam em uma das microfibrilas que formam a parede celular.

- A síntese do peptideoglicano da parede celular bacteriana também envolve oligossacarídeos ligados a lipídeos formados no interior da célula e rebatidos para o lado de fora para sua construção.

## 20.5 Integração do metabolismo de carboidratos na célula vegetal

O metabolismo de carboidratos em uma célula vegetal típica é, em muitos aspectos, mais complexo do que em uma célula animal típica. A célula vegetal realiza os mesmos processos que geram energia em células animais (glicólise, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa); ela pode gerar hexoses a partir de compostos de três e quatro carbonos pela gliconeogênese; ela pode oxidar hexoses-fosfato a pentoses-fosfato com a geração de NADPH (a via oxidativa das pentoses-fosfato); e ela pode produzir um polímero de glicose com ligações ($\alpha1\rightarrow4$) (amido) e degradá-lo para gerar hexoses. No entanto, além dessas transformações de carboidratos que ela partilha com a célula animal, a célula vegetal fotossintética pode fixar $CO_2$ em compostos orgânicos (a reação da rubisco); usar os produtos da fixação para gerar trioses, hexoses e pentoses (o ciclo de Calvin); e converter a acetil-CoA gerada da quebra de ácidos graxos em compostos de quatro carbonos (o ciclo do glioxilato) e os compostos de quatro carbonos em hexoses (gliconeogênese). Esses processos exclusivos da célula vegetal são segregados em vários compartimentos celulares não encontrados em células animais: o ciclo do glioxilato em glioxissomos, o ciclo de Calvin nos cloroplastos, a síntese de amido nos amiloplastos e o armazenamento de ácidos orgânicos nos vacúolos. A integração dos eventos entre esses vários compartimentos requer transportadores específicos nas membranas de cada organela para mover produtos de uma organela a outra ou para o citosol.

### A gliconeogênese converte gorduras e proteínas em glicose nas sementes em germinação

Muitas plantas armazenam lipídeos e proteínas em suas sementes, para serem usados como fontes de energia e como precursores biossintéticos durante a germinação, antes do desenvolvimento do mecanismo fotossintético. A gliconeogênese ativa em sementes em germinação fornece glicose para a síntese de sacarose, polissacarídeos e muitos outros metabólitos derivados de hexoses. Em mudas de plantas, a sacarose fornece a maior parte da energia química necessária para o crescimento inicial.

Foi observado anteriormente (Capítulo 14) que as células animais podem realizar a gliconeogênese a partir de precursores de três e quatro carbonos, mas não a partir dos dois carbonos acetila da acetil-CoA. Como a reação da piruvato-desidrogenase é efetivamente irreversível (Seção 16.1), as células animais não têm como converter acetil-CoA em piruvato ou oxaloacetato. Diferentemente dos animais, as plantas e alguns microrganismos *conseguem* converter a acetil-CoA proveniente da oxidação de ácidos graxos em glicose (**Figura 20-32**). Algumas enzimas es-

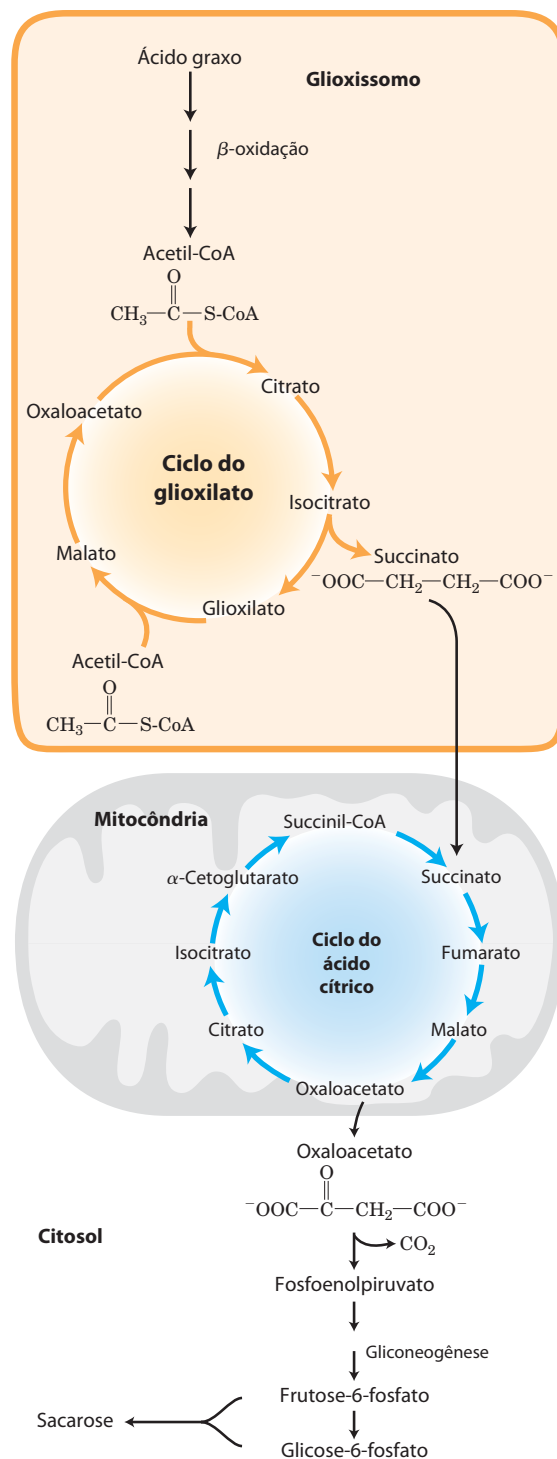



**FIGURA 20-32 Conversão de ácidos graxos armazenados em sacarose nas sementes em germinação.** Esta via inicia nos glioxissomos. O succinato é produzido e exportado para as mitocôndrias, onde é convertido em oxaloacetato por enzimas do ciclo do ácido cítrico. O oxaloacetato entra no citosol e serve como matéria-prima para a gliconeogênese e para a síntese de sacarose, a forma de transporte de carbono nas plantas.

senciais para essa conversão estão sequestradas nos glioxissomos, onde isoenzimas da $\beta$-oxidação específicas dos glioxissomos quebram os ácidos graxos até acetil-CoA (ver Figura 16-24). A separação física entre as enzimas do ciclo do glioxilato e da $\beta$-oxidação e as enzimas do ciclo do ácido cítrico mitocondrial impede a oxidação adicional da acetil-CoA a $CO_2$. Em vez disso, a acetil-CoA é convertida em succinato no ciclo do glioxilato (ver Figura 16-22). O succinato passa para a matriz mitocondrial, onde é convertido, pelas enzimas do ciclo do ácido cítrico, em oxaloacetato, que se desloca para o citosol. O oxaloacetato citosólico é convertido pela gliconeogênese em frutose-6-fosfato, o precursor da sacarose. Assim, faz-se necessária a integração de sequências de reações em três compartimentos celulares para a produção de frutose-6-fosfato ou sacarose a partir dos lipídeos armazenados. Como apenas três dos quatro carbonos em cada molécula de oxaloacetato são convertidos em hexose no citosol, cerca de 75% do carbono nos ácidos graxos armazenados como lipídeos nas sementes são convertidos em carboidratos pelas vias combinadas da Figura 20-32. Os outros 25% são perdidos como $CO_2$ na conversão de oxaloacetato em fosfoenolpiruvato. A hidrólise dos triacilgliceróis armazenados também produz glicerol-3-fosfato, que pode entrar na via gliconeogênica depois de sua oxidação a di-hidroxiacetona-fosfato (**Figura 20-33**).

Aminoácidos glicogênicos (ver Tabela 14-4) derivados da quebra de proteínas armazenadas em sementes também geram precursores para a gliconeogênese, após transaminação e oxidação a succinil-CoA, o piruvato, o oxaloacetato, o fumarato e o $\alpha$-cetoglutarato (Capítulo 18) – todos eles sendo boa matéria-prima para a gliconeogênese.

**FIGURA 20-33 Conversão da porção glicerol dos triacilgliceróis em sacarose nas sementes em germinação.** O glicerol dos triacilgliceróis é oxidado a di-hidroxiacetona-fosfato, que entra na via gliconeogênica na reação da triose-fosfato-isomerase.

## Conjuntos (*pools*) de intermediários em comum conectam vias em diferentes organelas

Embora a descrição das transformações metabólicas em células vegetais tenha sido feita em termos de vias individuais, essas vias se interconectam de forma tão completa que se devem considerar os conjuntos (*pools*) de intermediários metabólicos partilhados por essas vias e conectados por reações prontamente reversíveis (**Figura 20-34**). Um desses **conjuntos de metabólitos** inclui as hexoses-fosfato glicose-1-fosfato, a glicose-6-fosfato e a frutose-6-fosfato; um segundo inclui as pentoses 5-fosfato-ribose, a ribulose e a xilulose; um terceiro inclui as trioses-fosfato di-hidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-3-fosfato. Os fluxos de metabólitos por esses conjuntos mudam em magnitude e sentido em resposta a mudanças nas condições das plantas, variando com o tipo de tecido. Os transportadores nas membranas de cada organela movem compostos específicos para dentro e para fora, e a regulação desses transportadores presumivelmente influencia o grau com o qual os conjuntos se misturam.

Durante as horas de luz, as trioses-fosfato produzidas no tecido foliar pelo ciclo de Calvin saem do cloroplasto para o conjunto citosólico de hexoses-fosfato, onde são convertidas em sacarose para transporte a tecidos não fotossintéticos. Nesses tecidos, a sacarose é convertida em amido para armazenamento ou utilizada como fonte de energia por meio da glicólise. Em plantas em crescimento, as hexoses-fosfato também são retiradas do conjunto para a síntese de paredes celulares. À noite, o amido é metabolizado pela glicólise para prover energia, essencialmente como ocorre em organismos não fotossintéticos, e o NADPH e a ribose-5-fosfato são obtidos por meio da via oxidativa das pentoses-fosfato.

## RESUMO 20.5 Integração do metabolismo de carboidratos na célula vegetal

- As plantas podem sintetizar açúcares a partir da acetil-CoA, o produto da quebra de ácidos graxos, pelas ações combinadas do ciclo do glioxilato e da gliconeogênese.
- As vias individuais do metabolismo de carboidratos em plantas se sobrepõem intensamente; elas partilham conjuntos de intermediários comuns, incluindo hexoses-fosfato, pentoses-fosfato e trioses-fosfato. Os transportadores nas membranas dos cloroplastos, das mitocôndrias e dos amiloplastos medeiam o movimento de açúcares-fosfato entre as organelas. O sentido do fluxo de metabólitos através desses conjuntos muda do dia para a noite.

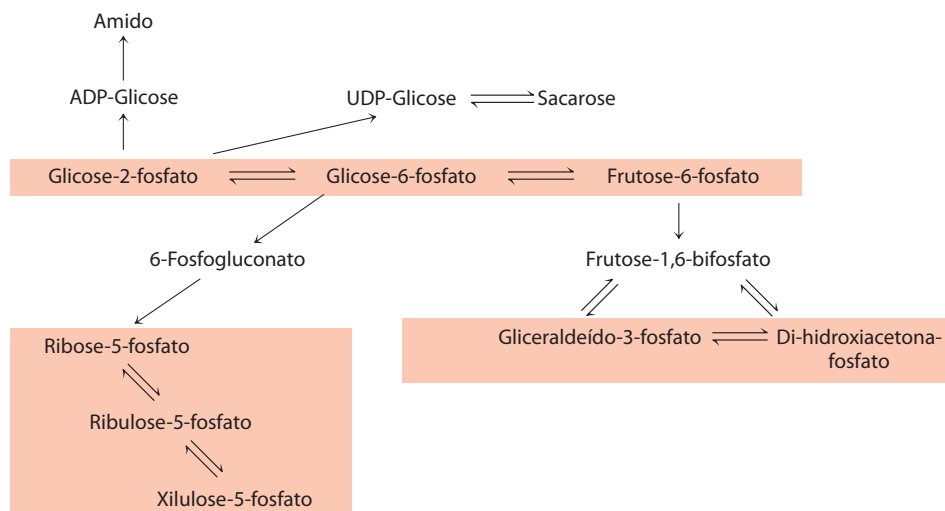



**FIGURA 20-34** ***Pools* de hexoses-fosfato, pentoses-fosfato e trioses--fosfato.** Os compostos em cada *pool* são prontamente interconversíveis por reações que têm pequenas mudanças de energia livre. Quando um componente do *pool* é temporariamente esgotado, um novo equilíbrio é rapidamente estabelecido. O movimento dos açúcares fosfato entre os compartimentos intracelulares é limitado; transportadores específicos precisam estar presentes em uma membrana de organela.

## Termos-chave

*Os termos em negrito estão definidos no glossário.*

**ciclo de Calvin** 800
**plastídeo** 800
**cloroplasto** 800
amiloplasto 800
**reação de fixação do carbono** 801
ribulose-1,5-bifosfato 801
3-fosfoglicerato 801
**via das pentoses--fosfato** 801
ciclo redutor das pentoses-fosfato 801
plantas $C_3$ 802
**ribulose-1,5-bifosfato--carboxilase/oxigenase (rubisco)** 802
rubisco-ativase 804
aldolase 805
transcetolase 805
sedoeptulose-1,7-bifosfato 806
ribulose-5-fosfato 806
**reações de assimilação de carbono** 809
tiorredoxina 811
ferredoxina-tiorredoxina--redutase 811
**fotorrespiração** 812
2-fosfoglicolato 812
**via do glicolato** 813
ciclo oxidativo fotossintético do carbono (ciclo $C_2$) 815
**plantas $C_4$** 815
fosfoenolpiruvato-carboxilase 815
enzima málica 816
piruvato-fosfato-dicinase 817
**plantas CAM** 818
açúcares nucleotídeos 819
ADP-glicose 819
amido-sintase 819
sacarose-6-fosfato-sintase 819
frutose-2,6-bifosfato 820
ADP-glicose-pirofosforilase 821
celulose-sintase 821
**peptideoglicano** 823
conjuntos *(pools)* de metabólitos 826

## Leituras adicionais

### Referências gerais

**Blankenship, R.E.** (2002) *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*, Blackwell Science, Oxford.

De fácil leitura, bem ilustrado, com a apresentação em nível intermediário de todos os aspectos da fotossíntese, incluindo o metabolismo do carbono coberto neste capítulo e as reações promovidas pela luz descritas no Capítulo 19.

**Buchanan, B.B., Gruissem, W., & Jones, R.L. (eds).** (2002) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiology, Rockville, MD.

Este livro maravilhoso, escrito por autoridades no assunto, cobre todos os aspectos da bioquímica e da biologia molecular das plantas. Os seguintes capítulos cobrem a síntese e estrutura de carboidratos com maior profundidade: Carpita, N. & McCann, M., Capítulo 2, The cell wall (pp. 52–109); **Malkin, R. & Niyogi, K.**, Capítulo 12, Fotossíntese (p. 568-629); **Dennis, D.T. & Blakeley, S.D.**, Capítulo 13, Metabolismo de Carboidratos (p. 630-675); **Siedow J.N. & Day, D.A.**, Capítulo 14, Respiração e Fotorrespiração (p. 676-729).

**Heldt, H.-W. & Piechulla (2010)** (1997) *Plant Biochemistry*, 4th edn., Academic Press, New York.

Um *excelente* livro-texto de bioquímica vegetal.

**Morton, O.** (2007) *Eating the Sun: How Plants Power the Planet*, Harper, New York.

Um relato envolvente sobre as descobertas da fotossíntese no contexto da história da ciência.

### Síntese fotossintética de carboidratos

**Andersson, I. & Backlund, A.** (2008) Structure and function of rubisco. *Plant Physiol. Biochem.* **46**, 275-291

Revisão de nível intermediário.

**Bassham, J.A.** (2003) Mapping the carbon reduction cycle: a personal retrospective. *Photosynth. Res.* **76**, 35–52.

**Benson, A.A.** (2002) Following the path of carbon in photosynthesis: a personal story—history of photosynthesis. *Photosynth. Res.* **73**, 31–49.

**Calvin, M.** (1989) Forty years of photosynthesis and related activities. *Photosynth. Res.* **21**, 3–16.

**Cleland, W.W., Andrews, T.J., Gutteridge, S., Hartman, F.C., & Lorimer, G.H.** (1998) Mechanism of rubisco—the carbamate as general base. *Chem. Rev.* **98**, 549–561.

Revisão enfocando especialmente o carbamato no sítio ativo.

**Dietz, K.J., Link, G., Pistorius, E.K., & Scheibe, R.** (2002) Redox regulation in oxygenic photosynthesis. *Prog. Botany* **63**, 207–245.

**Hartman, F.C. & Harpel, M.R.** (1994) Structure, function, regulation and assembly of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 197–234.

**Horecker, B.L.** (2002) The pentose phosphate pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 47,965–47,971.

**Jansson, C., Wullschleger, S.D., Kalluri, U.S., & Tuskan, G.A.** (2010) Phytosequestration: carbon biosequestration by plants and the prospects of genetic engineering. *Bioscience* **60**, 685–696.

Fluxos globais de carbono e a contribuição da biomassa para o carbono terrestre total.

**Portis, A.R., Jr.** (2003) Rubisco activase: rubisco's catalytic chaperone. *Photosynth. Res.* **75**, 11–27.

Estrutura, regulação, mecanismo e importância da rubiscoativase.

**Portis, A.R., Jr. & Parry, M.A.J.** (2007) Discoveries in rubisco (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): a historical perspective. *Photosynth. Res.* **94**, 121–143.

**Raines, C.A.** (2003) The Calvin cycle revisited. *Photosynth. Res.* **75**, 1–10. Metabolic control analysis applied to the Calvin cycle.

**Sage, R.F., Way, D.A., & Kubien, D.S.** (2008) Rubisco, rubisco activase, and global climate change. *J. Exper. Bot.* **59**, 1581–1595.

**Smith, A.M., Denyer, K., & Martin, C.** (1997) The synthesis of the starch granule. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 67–87.

Revisão do papel da ADP-glicose-pirofosforilase na síntese de amilose e amilopectina em grânulos de amido.

**Spreitzer, R.J. & Salvucci, M.E.** (2002). Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 449–475.

Revisão avançada sobre a rubisco e a rubiscoativase.

**Whitney, S.M., Houtz, R.L., & Alonso, H.** (2011) Advancing our understanding and capacity to engineer nature's $CO_2$-sequestering enzyme, rubisco. *Plant Physiol.* **155**, 27–35.

## Fotorrespiração e as vias $C_4$ e CAM

**Ainsworth, E.A. & Long, S.P.** (2005) What have we learned from 15 years of free-air $CO_2$ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the response of photosynthesis, canopy properties, and plant production to rising $CO_2$. *New Phytol.* **165**, 351–372.

**Bauwe, H., Hagemann, M., & Fernie, A.R.** (2010) Photorespiration: players, partners and origin. *Trends Plant Sci.* **15**, 330–336.

**Black, C.C. & Osmond, C.B.** (2003) Crassulacean acid metabolism and photosynthesis: working the night shift. *Photosynth. Res.* **76**, 329–341.

**Douce, R., Bourguignon, J., Neuburger, M., & Rébeillé, F.** (2001) The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends Plant Sci.* **6**, 167–176.

Descrição em nível intermediário da estrutura e do mecanismo de reação da enzima.

**Hatch, M.D.** (1987) $C_4$ photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochim. Biophys. Acta* **895**, 81–106.

Revisão de nível intermediário por um dos descobridores da via $C_4$.

**Hatch, M.D. & Slack, S.R.** (1966) Photosynthesis by sugar-cane leaves: a new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. *Biochem. J.* **101**,103–111.

Descrição clássica da via, nomeada por estes autores.

**Langdale, J.A.** (2011) C4 cycles: past, present, and future research on C4 photosynthesis. *Plant Cell* **23**, 3879–3892.

Revisão de nível intermediário.

**Tolbert, N.E.** (1997) The $C_2$ oxidative photosynthetic carbon cycle. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 1–25.

Um relato pessoal fascinante do desenvolvimento da compreensão da fotorrespiração por alguém que foi essencial neste desenvolvimento.

## Biossíntese de amido e sacarose

**Doblin, M.S., Kurek, I., Javob-Wilk, D., & Delmer, D.P.** (2002) Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant Cell Physiol.* **43**, 1407–1420.

**Huber, S.C. & Huber, J.L.** (1996) Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 431–444.

Breve revisão dos fatores que regulam esta importante enzima.

**Keeling, P.L & Myers, A.M.** (2010) Biochemistry and genetics of starch synthesis. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **1**, 271–303.

Revisão avançada.

**Kotting, O., Kossmann, J., Zeeman, S.C., & Lloyd, J.R.** (2010) Regulation of starch metabolism: the age of enlightenment? *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**, 321–329.

**Leloir, L.F.** (1971) Two decades of research on the biosynthesis of saccharides. *Science* **172**, 1299–1303.

Discurso de Leloir ao receber o Nobel, incluindo uma discussão do papel dos açúcares nucleotídeos no metabolismo.

## Síntese de celulose e do peptideoglicano

**Endler, A. & Persson, S.** (2011) Cellulose synthases and synthesis in *Arabidopsis*. *Mol.Plant* **4**, 99–211.

**Joshi, C.P. & Mansfield, S.D.** (2007) The cellulose paradox— simple molecule, complex biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 220–226.

**Liepman, A.H., Andrews, T.J., Gutteridge, S., Hartman, F.C., & Lorimer, G.H.** (2010) *Arabidopsis*—a powerful model system for plant cell wall research. *Plant J.* **61**, 1107–1121.

**Scheible, W.-R. & Pauly, M.** (2004) Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 285–296.

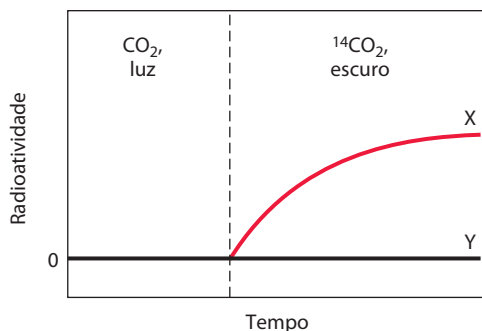
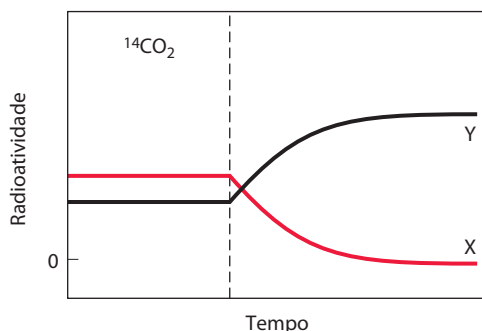
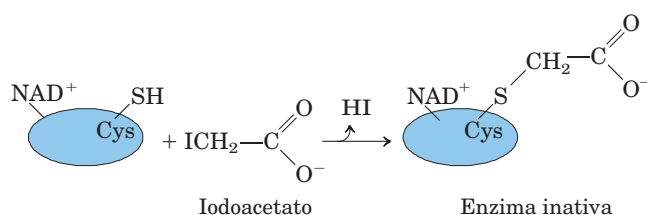
**Vollmer, W. & Seligman, S.J.** (2009) Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends Microbiol.* **18**, 59–66.

## Problemas

**1. Segregação do metabolismo nas organelas.** Quais são as vantagens para uma célula vegetal de ter diferentes organelas para realizar diferentes sequências de reações com intermediários em comum?

**2. Fases da fotossíntese.** Quando uma suspensão de algas verdes é iluminada na ausência de $CO_2$ e então incubada com $^{14}CO_2$ no escuro, $^{14}CO_2$ é convertido em [$^{14}$C]glicose por um tempo curto. Qual o significado dessa observação com relação ao processo de assimilação de $CO_2$ e como ela está relacionada às reações na fase clara (luz) da fotossíntese? Por que a conversão de $^{14}CO_2$ em [$^{14}$C]glicose cessa depois de um curto período?

**3. Identificação de intermediários-chave na assimilação de $CO_2$.** Calvin e colaboradores usaram a alga verde unicelular *Chlorella* para estudar as reações de assimilação de carbono da fotossíntese. Eles incubaram $^{14}CO_2$ com suspensões iluminadas de algas e acompanharam o curso temporal de aparecimento de $^{14}$C em dois compostos, X e Y, sob dois conjuntos de condições. Sugira as identidades de X e Y com base em sua compreensão do ciclo de Calvin.

(a) Células iluminadas de *Chlorella* foram cultivadas com $CO_2$ não marcado; a luz foi então desligada, e $^{14}CO_2$ foi adicionado (linha tracejada vertical no gráfico abaixo). Nessas condições, X foi o primeiro composto a ficar marcado com $^{14}$C; Y não estava marcado.

(b) Células iluminadas de *Chlorella* foram cultivadas com $^{14}CO_2$. A iluminação foi mantida até que todo o $^{14}CO_2$ tivesse desaparecido (linha tracejada vertical no gráfico abaixo). Nessas condições, X tornou-se rapidamente marcado, mas perdeu sua radioatividade com o tempo, enquanto Y tornou-se mais radioativo com o tempo.

**4. Regulação do ciclo de Calvin.** Iodoacetato reage irreversivelmente com os grupos–SH livres dos resíduos de Cys nas proteínas.

Preveja que enzima(s) do ciclo de Calvin seria(m) inibida(s) por iodoacetato e explique por que.

**5. A tiorredoxina na regulação das enzimas do ciclo de Calvin.** Motohashi e colaboradores usaram tiorredoxina como um anzol para pescar, dos extratos vegetais, as proteínas ativadas pela tiorredoxina. Para fazer isso, eles prepararam uma tiorredoxina mutante, na qual um dos resíduos de Cys reativos foi substituído por uma Ser. Explique por que essa modificação foi necessária para tais experimentos. Fonte: **Motohashi, K., Kondoh, A., Stumpp, M.T., & Hisabori, T.** (2001) Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 11,224–11,229.

**6. Comparação das vias redutora e oxidativa das pentoses-fosfato.** A via *redutora* das pentoses-fosfato gera uma série de intermediários idênticos aos da via *oxidativa* das pentoses-fosfato (Capítulo 14). Que papel cada via desempenha nas células onde é ativa?

**7. Fotorrespiração e respiração mitocondrial.** Compare o ciclo fotossintético oxidativo do carbono (ciclo $C_2$), também chamado de *fotorrespiração*, com a *respiração mitocondrial*, que promove a síntese de ATP. Por que ambos os processos são denominados respiração? Em que parte da célula eles ocorrem e sob que circunstâncias? Qual a via de fluxo de elétrons em cada processo?

**8. A rubisco e a composição da atmosfera.** N. E. Tolbert argumentou que a dupla especificidade da rubisco por $CO_2$ e $O_2$ não é simplesmente um resíduo da evolução em um ambiente pobre em oxigênio. Ele sugere que as atividades relativas das atividades de carboxilase e oxigenase da rubisco na verdade estabeleceram e hoje mantêm a razão de $CO_2$ para $O_2$ na atmosfera terrestre. Discuta os prós e contras dessa hipótese em termos moleculares e em termos globais. De que forma a existência de organismos $C_4$ é relevante para a hipótese? Fonte: **Tolbert, N.E.** (1994) The role of photosynthesis and photorespiration in regulating atmospheric $CO_2$ and $O_2$. In *Regulation of Atmospheric $CO_2$ and $O_2$ by Photosynthetic Carbon Metabolism* (Tolbert, N.E., & Preiss, J., eds), pp. 8–33, Oxford University Press, New York.

**9. O papel da sedoeptulose-1,7-bifosfatase.** Que efeito na célula ou no organismo pode acarretar um defeito na sedoeptulose-1,7-bifosfatase em (a) um hepatócito humano e (b) na célula foliar de uma planta verde?

**10. A via de assimilação do $CO_2$ no milho.** Se uma planta de milho é iluminada na presença de $^{14}CO_2$, depois de cerca de 1 segundo, mais de 90% de toda a radioatividade incorporada nas folhas são encontrados no C-4 do malato, do aspartato e do oxaloacetato. Apenas após 60 segundos é que o $^{14}C$ aparece no C-1 do 3-fosfoglicerato. Explique.

**11. Identificando as plantas CAM.** De posse de algum $^{14}CO_2$ e de todas as ferramentas normalmente presentes em um laboratório de pesquisa em bioquímica, como você delinearia um experimento simples para determinar se uma planta é uma típica $C_4$ ou uma CAM?

**12. Química da enzima málica: variação em um tema.** A enzima málica, encontrada nas células da bainha vascular das plantas $C_4$, realiza uma reação que tem uma análoga no ciclo do ácido cítrico. Qual a reação análoga? Explique sua escolha.

**13. O custo de armazenar glicose como amido.** Escreva a sequência de etapas e a reação resultante necessária para calcular o custo, em moléculas de ATP, para a conversão de uma molécula de glicose-6-fosfato citosólica em amido e de volta em glicose-6-fosfato. Que fração esse custo representa do número máximo de moléculas de ATP disponível para o catabolismo completo da glicose-6-fosfato a $CO_2$ e $H_2O$?

**14. Pirofosfatase inorgânica.** A enzima pirofosfatase inorgânica contribui para tornar muitas reações biossintéticas que geram pirofosfato inorgânico essencialmente irreversíveis em células. Mantendo a concentração de $PP_i$ muito baixa, a enzima "puxa" as reações na direção da formação de $PP_i$. A síntese de ADP-glicose nos cloroplastos é uma das reações que é puxada nesta direção por este mecanismo. No entanto, a síntese de UDP-glicose no citosol vegetal, que também produz $PP_i$, é prontamente reversível *in vivo*. Como você concilia esses dois fatos?

**15. Regulação da síntese de amido e sacarose.** A síntese de sacarose ocorre no citosol e a síntese de amido no

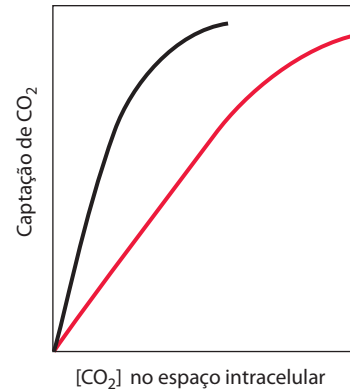
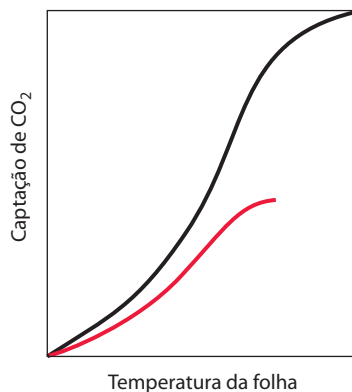
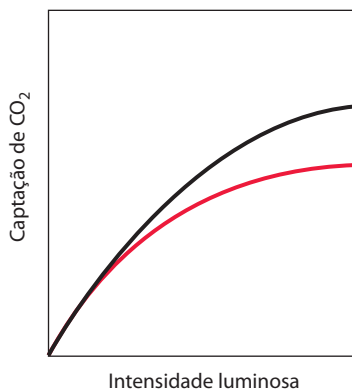
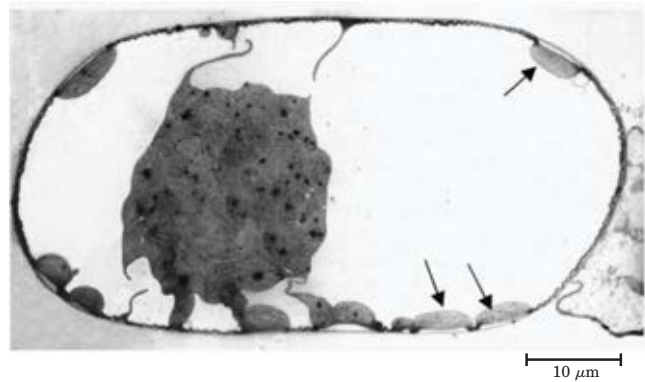
estroma do cloroplasto; mesmo assim, os dois processos estão intrincadamente equilibrados. Que fatores deslocam as reações em favor (a) da síntese de amido e (b) da síntese de sacarose?

**16. Regulação da síntese de sacarose.** Na regulação da síntese de sacarose a partir das trioses-fosfato produzidas durante a fotossíntese, 3-fosfoglicerato e $P_i$ desempenham papéis críticos (ver Figura 20-25). Explique por que a concentração desses dois reguladores reflete a velocidade da fotossíntese.

**17. Sacarose e cáries dentárias.** A infecção humana mais prevalente em uma escala global é a cárie dentária, que decorre da colonização e da destruição do esmalte do dente por uma variedade de microrganismos acidificadores. Esses organismos sintetizam e vivem dentro de uma rede de dextranas insolúveis em água, chamada de placa dentária, composta por polímeros de glicose com ligações ($\alpha$1→6) com muitos pontos de ramificação ($\alpha$1→3). A polimerização da dextrana requer sacarose da dieta, e a reação é catalisada por uma enzima bacteriana, dextrana-sacarose-glicosiltransferase.

(a) Escreva a reação global para a polimerização da dextrana.

(b) Além de fornecer um substrato para a formação da placa dentária, de que forma a sacarose da dieta também provê as bactérias orais com abundante fonte de energia metabólica?

**18. Diferenças entre plantas $C_3$ e $C_4$.** O gênero vegetal *Atriplex* inclui algumas espécies $C_3$ e algumas espécies $C_4$. A partir dos dados nos gráficos que seguem (espécie 1, curva preta; espécie 2, curva vermelha), identifique qual é uma planta $C_3$ e qual é uma planta $C_4$. Justifique sua resposta em termos moleculares que levem em consideração os dados em todas as três curvas.

**19. A via $C_4$ em uma única célula.** Em plantas $C_4$ típicas, a captura inicial do $CO_2$ ocorre em um tipo de célula, e as reações do ciclo de Calvin em outro (ver Figura 20-23). Voznesenskaya e colaboradores descreveram uma planta, *Bienertia cycloptera* – que cresce em depressões salinas de semidesertos na Ásia Central – que mostra as propriedades bioquímicas de uma planta $C_4$, mas que, ao contrário das plantas $C_4$ típicas, não segrega as reações de fixação de $CO_2$ em dois tipos de células. A PEP-carboxilase e a rubisco estão presentes na mesma célula. No entanto, as células têm dois tipos de cloroplastos, diferentemente localizados. Um tipo, relativamente pobre em grana (tilacoides), está confinado à periferia; os cloroplastos mais típicos estão agrupados no centro da célula, separados dos cloroplastos periféricos por grandes vacúolos. Estreitas pontes citosólicas passam através dos vacúolos, conectando o citosol periférico e o central. Uma micrografia de uma célula de *B. cycloptera*, com setas apontando para os cloroplastos periféricos, é mostrada abaixo.

Nesta planta, onde você esperaria encontrar (a) PEP-carboxilase, (b) rubisco e (c) grânulos de amido? Explique suas respostas com um modelo para a fixação de $CO_2$ nestas células $C_4$.

Fonte: **Voznesenskaya, E.V., Fraceschi, V.R., Kiirats, O., Artyusheva, E.G., Freitag, H., & Edwards, G.E.** (2002) Proof of C4 photosynthesis without Kranz anatomy in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae). *Plant J.* **31**, 649–662.

## Problema de análise de dados

**20. Rubisco de endossimbiontes bacterianos de animais de chaminés hidrotermais.** Chaminés hidrotermais submarinas sustentam ecossistemas notáveis. Nessas profun-

didades extremas, não existe luz para sustentar a fotossíntese e, mesmo assim, as comunidades dessas chaminés prosperam. A maior parte de sua produtividade primária ocorre por meio da quimiossíntese realizada por bactérias simbiontes que vivem em órgãos especiais (trofossomos) de certos animas das chaminés.

A quimiossíntese nessas bactérias envolve um processo praticamente idêntico à fotossíntese. O dióxido de carbono é fixado pela rubisco e reduzido a glicose, e o ATP e o NADPH necessários são produzidos por processos de transferência de elétrons similares àqueles das reações dependentes de luz da fotossíntese. A diferença-chave é que na quimiossíntese a energia que promove a transferência de elétrons vem de uma reação química altamente exergônica em vez de vir da luz. Bactérias quimiossintéticas diferentes usam reações diferentes com esse propósito. As bactérias encontradas em animais de chaminés hidrotermais geralmente usam a oxidação do $H_2S$ (abundante na água da chaminé) pelo $O_2$, produzindo enxofre elementar. Essas bactérias também usam a conversão de $H_2S$ em enxofre como fonte de elétrons para a redução quimiossintética do $CO_2$.

(a) Qual a reação global para a quimiossíntese nessas bactérias? Você não precisa escrever a reação balanceada; apenas forneça os materiais de origem e os produtos.

(b) Em última análise, essas bactérias endossimbiontes obtêm sua energia da luz solar. Explique como isso ocorre.

Robinson e colaboradores (2003) exploraram as propriedades da rubisco do endossimbionte bacteriano do verme tubiforme gigante *Riftia pachyptila*. A rubisco de qualquer fonte catalisa a reação do $CO_2$ (Figura 20-7) ou do $O_2$ (Figura 20-20) com a ribulose-1,5-bifosfato. Em geral, a rubisco reage mais prontamente com o $CO_2$ do que com o $O_2$. O grau de seletividade ($\Omega$) pode ser expresso na

$$\frac{V_{\text{carboxilação}}}{V_{\text{oxigenação}}} = \Omega \frac{[CO_2]}{[O_2]}$$

onde $V$ é a velocidade de reação.

Robinson e colaboradores mediram o valor de $\Omega$ para a rubisco dos endossimbiontes bacterianos. Eles purificaram a rubisco dos trofossomos dos vermes tubiformes, observaram sua reação com misturas de diferentes razões de $O_2$ e $CO_2$ na presença de [1-$^3$H]ribulose-1,5-bifosfato e mediram a razão de [$^3$H]fosfoglicerato para [$^3$H]fosfoglicolato.

(c) A razão medida de [$^3$H]fosfoglicerato para [$^3$H]fosfoglicolato é igual à razão $V_{\text{carboxilação}}/V_{\text{oxigenação}}$. Explique por quê.

(d) Por que a [5-$^3$H]ribulose-1,5-bifosfato não seria um bom substrato para esse ensaio?

O $\Omega$ para a rubisco do endossimbionte teve um valor de 8,6 $\pm$ 0,9.

(e) A concentração (molar) atmosférica de $O_2$ é de 20% e a do $CO_2$ é de cerca de 380 partes por milhão. Se o endossimbionte fosse realizar a quimiossíntese sob essas condições atmosféricas, qual seria o valor de $V_{\text{carboxilação}}/V_{\text{oxigenação}}$?

(f) Com base em sua resposta em (e), você esperaria que o $\Omega$ para a rubisco de uma planta terrestre fosse maior, igual ou menor do que 8,6? Explique seu raciocínio.

Dois isótopos estáveis de carbono são comumente encontrados no ambiente: o mais abundante $^{12}$C e o mais raro $^{13}$C. Todas as enzimas rubisco catalisam a fixação de $^{12}CO_2$ mais rapidamente do que a de $^{13}CO_2$. Como resultado, o carbono na glicose é levemente mais enriquecido em $^{12}$C em comparação com a composição isotópica do $CO_2$ no ambiente. Diversos fatores estão envolvidos nesse uso "preferencial" do $^{12}CO_2$, mas um fator é a física fundamental dos gases. A temperatura de um gás está relacionada à energia cinética de suas moléculas. A energia cinética é dada por ½ $mv^2$, onde $m$ é a massa molecular e $v$ é a velocidade. Assim, na mesma temperatura (mesma energia cinética), as moléculas de um gás mais leve se moverão mais rapidamente do que aquelas de um gás mais pesado.

(g) De que forma isso contribui para a "preferência" da rubisco pelo $^{12}CO_2$ em relação ao $^{13}CO_2$? Uma das primeiras evidências convincentes de que os vermes tubiformes hospedeiros estavam obtendo seu carbono fixado dos endossimbiontes foi que a razão $^{13}$C/$^{12}$C nos animais era bem mais próxima da razão nas bactérias do que aquela nos animais marinhos que não habitam as chaminés.

(h) Por que essa é uma evidência mais convincente para uma relação endossimbiótica do que estudos mais antigos, que simplesmente mostraram a presença de rubisco nas bactérias encontradas nos trofossomos?

## Referência

**Robinson, J.J., Scott, K.M., Swanson, S.T., O'Leary, M.H., Horken, K., Tabita, F.R., & Cavanaugh, C.M.** (2003) Kinetic isotope effect and characterization of form II RubisCO from the chemoautotrophic endosymbionts of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila. Limnol. Oceanogr.* **48**, 48-54.

# 21

# Biossíntese de Lipídeos



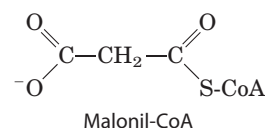
Os lipídeos desempenham uma grande variedade de funções celulares, algumas delas apenas recentemente reconhecidas. Eles são a principal forma de armazenamento de energia na maioria dos organismos e os principais constituintes das membranas celulares. Lipídeos especializados atuam como pigmentos (retinal, caroteno), cofatores (vitamina K), detergentes (sais biliares), transportadores (dolicóis), hormônios (derivados da vitamina D, hormônios sexuais), mensageiros extracelulares e intracelulares (eicosanoides, derivados do fosfatidilinositol) e âncoras para proteínas de membrana (ácidos graxos covalentemente ligados, grupos prenila e fosfatidilinositol). A capacidade de sintetizar uma variedade de lipídeos é essencial para todos os organismos. Este capítulo descreve as vias biossintéticas para alguns dos lipídeos celulares mais comuns, ilustrando as estratégias utilizadas para sintetizar esses produtos insolúveis em água a partir de precursores hidrossolúveis, como o acetato. Assim como outras vias biossintéticas, essas sequências de reações são endergônicas e redutoras. Utilizam ATP como fonte de energia metabólica e um transportador de elétrons reduzido (geralmente o NADPH) como agente redutor.

Primeiramente, será descrita a biossíntese dos ácidos graxos, os principais componentes dos triacilgliceróis e dos fosfolipídeos; a seguir, será examinada a montagem dos ácidos graxos em triacilgliceróis e nos tipos mais simples de fosfolipídeos de membrana. Finalmente, será abordada a síntese do colesterol, componente de algumas membranas e o precursor de esteroides, como os ácidos biliares, os hormônios sexuais e os hormônios adrenocorticais.

## 21.1 Biossíntese de ácidos graxos e eicosanoides

Após a descoberta de que a oxidação dos ácidos graxos ocorre pela remoção oxidativa e sucessiva de unidades com dois átomos de carbono (acetil-CoA) (ver Figura 17-8), os bioquímicos pensaram que a biossíntese dos ácidos graxos poderia ocorrer pela simples inversão dos mesmos passos enzimáticos. No entanto, como eles vieram a descobrir, a biossíntese e a degradação dos ácidos graxos ocorrem por meio de diferentes vias, são catalisadas por diferentes grupos de enzimas e localizam-se em compartimentos distintos na célula. Além disso, a biossíntese requer a participação de um intermediário de três carbonos, a **malonil-CoA**, que não está envolvido na degradação dos ácidos graxos.

$$^{-}O(O{=})C{-}CH_2{-}C({=}O)S\text{-}CoA$$

Malonil-CoA

Primeiro, será apresentada a via de síntese dos ácidos graxos; a seguir, será dedicada atenção à regulação da via e à biossíntese dos ácidos graxos de cadeia mais longa, dos ácidos graxos insaturados e dos seus derivados eicosanoides.

### A malonil-CoA é formada a partir de acetil-CoA e bicarbonato

A formação de malonil-CoA a partir de acetil-CoA é um processo irreversível, catalisado pela **acetil-CoA-carboxilase**. A enzima bacteriana contém três subunidades polipeptídicas distintas (**Figura 21-1**); em células animais, todas as três atividades fazem parte de um único polipeptídeo multifuncional. As células vegetais têm os dois tipos de acetil-CoA-carboxilase. Em todos os casos, a enzima contém um grupo prostético, a biotina, covalentemente ligado por uma ligação amida ao grupo $\varepsilon$-amino de um resíduo de Lys presente em um dos três polipeptídeos ou domínios da molécula da enzima. A reação em duas etapas catalisada por essa enzima é muito semelhante a outras reações de carboxilação dependente de biotina, como aquelas catalisadas pela piruvato-carboxilase (ver Figura 16-17) e pela propionil-CoA-carboxilase (ver Figura 17-12). Primeiramente, um grupo carboxil derivado do bicarbonato ($HCO_3^-$) é transferido para a biotina em uma reação dependente de ATP. O grupo biotinila age como transportador temporário de $CO_2$, transferindo-o para a acetil-CoA na segunda etapa, gerando malonil-CoA.

**FIGURA 21-1 A reação da acetil-CoA-carboxilase.** A acetil-CoA-carboxilase contém três regiões funcionais: a proteína carreadora de biotina (em cinza); a biotina-carboxilase, que ativa $CO_2$ pela sua ligação a um átomo de nitrogênio no anel de biotina em uma reação dependente de ATP (ver Figura 16-17); e a transcarboxilase, que transfere o $CO_2$ ativado (sombreado em verde) da biotina para a acetil-CoA, produzindo malonil-CoA. O braço longo e flexível da biotina transporta o $CO_2$ ativado da região da biotina-carboxilase para o sítio ativo da transcarboxilase. A enzima ativa, em cada etapa, está sombreada em azul.

## A síntese dos ácidos graxos ocorre em uma sequência de reações que se repetem

Em todos os organismos, as longas cadeias de carbono dos ácidos graxos são construídas por uma sequência de reações repetitivas, em quatro etapas (**Figura 21-2**), catalisadas por um sistema coletivamente conhecido como **ácido graxo-sintase**. Um grupamento acila saturado, produzido em cada série de reações em quatro etapas, torna-se o substrato da condensação subsequente com um grupo malonila ativado. Em cada uma das passagens pelo ciclo, a cadeia do grupo acila graxo aumenta em dois carbonos.

Na sequência anabólica redutora, tanto o cofator transportador de elétrons quanto os grupos ativadores diferem daqueles do processo catabólico oxidativo. Lembre-se que na $\beta$-oxidação, $NAD^+$ e FAD atuam como aceptores de elétrons e o grupo ativador é o grupo tiol (—SH) da coenzima A (ver Figura 17-8). Por outro lado, o agente redutor na via sintética é o NADPH e os grupos ativadores são dois grupos —SH diferentes ligados à enzima, como descrito na seção a seguir.

Existem duas variantes principais da enzima ácido graxo-sintase: a ácido graxo-sintase I (AGS I), encontrada em vertebrados e em fungos, e a ácido graxo-sintase II (AGS II), encontrada em vegetais e bactérias. A AGS I, encontrada em vertebrados, consiste em uma única cadeia polipeptídica multifuncional ($M_r$ 240.000). A enzima AGS I de mamíferos é o protótipo. Sete sítios ativos para reações distintas estão presentes em domínios separados (**Figura 21-3a**). O polipeptídeo de mamíferos funciona como homodímero ($M_r$ 480.000). As subunidades parecem agir independentemente. Quando todos os sítios ativos de uma subunidade são inativados por mutação, a síntese dos ácidos graxos é apenas levemente reduzida. A enzima AGS I encontrada em leveduras e outros fungos é um pouco diferente. Ela consiste em dois polipeptídeos multifuncionais que formam um complexo com uma arquitetura distinta do sistema em vertebrados (Figura 21-3b). Três dos sete sítios ativos necessários são encontrados na subunidade $\alpha$ e quatro na subunidade $\beta$.

Com os sistemas AGS I, a síntese dos ácidos graxos leva a um único produto, e não são liberados intermediários. Quando o comprimento da cadeia atinge 16 carbonos, esse produto (palmitato, 16:0; ver Tabela 10-1) deixa o ciclo. Os carbonos C-16 e C-15 do palmitato são derivados dos átomos de carbono dos grupos metil e carboxil, respectivamente, de uma acetil-CoA utilizada diretamente para iniciar o sistema (**Figura 21-4**); os outros átomos de carbono da cadeia são originados da acetil-CoA via malonil-CoA.

A AGS II, de vegetais e bactérias, é um sistema dissociado; cada etapa da síntese é catalisada por uma enzima distinta e livremente difusível. Os intermediários também são difusíveis e podem ser desviados para outras vias (como a síntese de ácido lipoico). Ao contrário da AGS I, a enzima AGS II gera uma variedade de produtos, inclusive ácidos graxos saturados de vários comprimentos, assim como insaturados, ramificados e hidróxiácidos graxos. Um sistema AGS II também é encontrado nas mitocôndrias de vertebrados. A discussão a seguir terá como foco a enzima AGS I de mamíferos.

## A ácido graxo-sintase de mamíferos tem múltiplos sítios ativos

Os múltiplos domínios da AGS I de mamíferos atuam como enzimas distintas, porém ligadas. O sítio ativo de cada enzi-

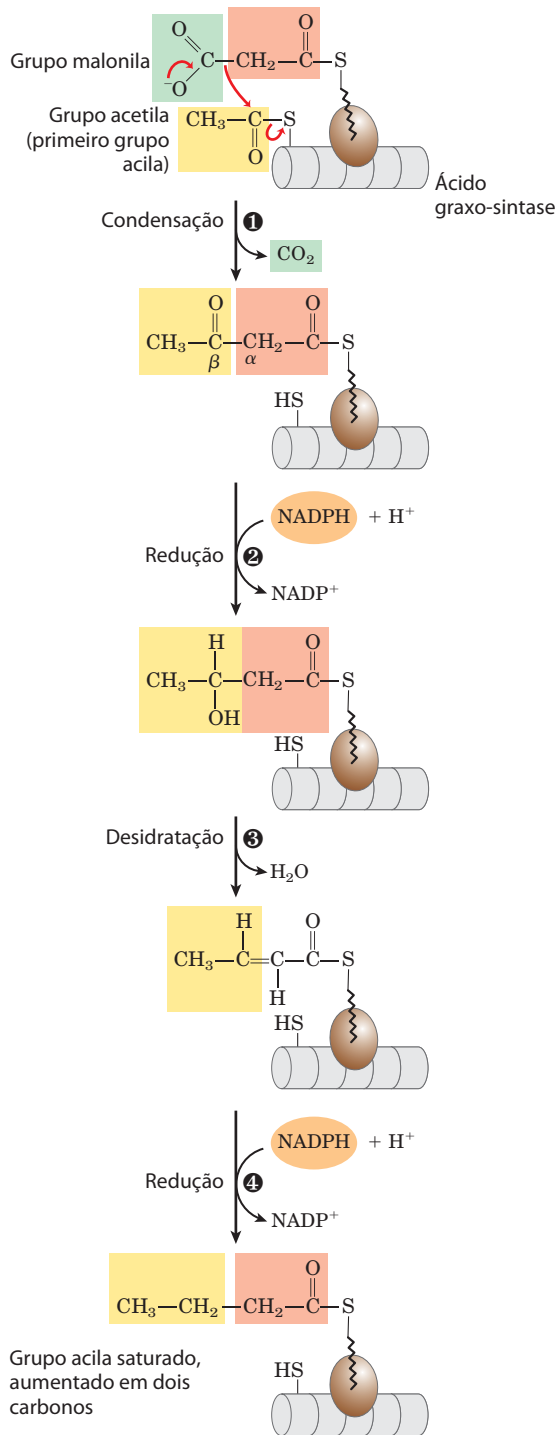



**FIGURA 21-2 Adição de dois carbonos a uma cadeia acil graxo em crescimento: uma sequência de quatro etapas.** Cada grupo malonila e acetila (ou acilas maiores) é ativado por um tioéster que os une à ácido graxo--sintase, um sistema multienzimático descrito no texto. ❶ A condensação de um grupo acila ativado (um grupo acetil da acetil-CoA é o primeiro grupo acila) e dois carbonos derivados da malonil-CoA, com a eliminação de $CO_2$ do grupo malonila, alonga a cadeia acila em dois carbonos. O mecanismo da primeira etapa dessa reação está mostrado para ilustrar o papel da descarboxilação em facilitar a condensação. O produto $\beta$-cetônico dessa condensação é, então, reduzido em três etapas seguintes praticamente idênticas às reações de $\beta$-oxidação, mas na sequência inversa; ❷ o grupo $\beta$-cetônico é reduzido a um álcool, ❸ a eliminação de $H_2O$ cria uma ligação dupla, e ❹ a ligação dupla é reduzida, formando o grupo acil graxo saturado correspondente.

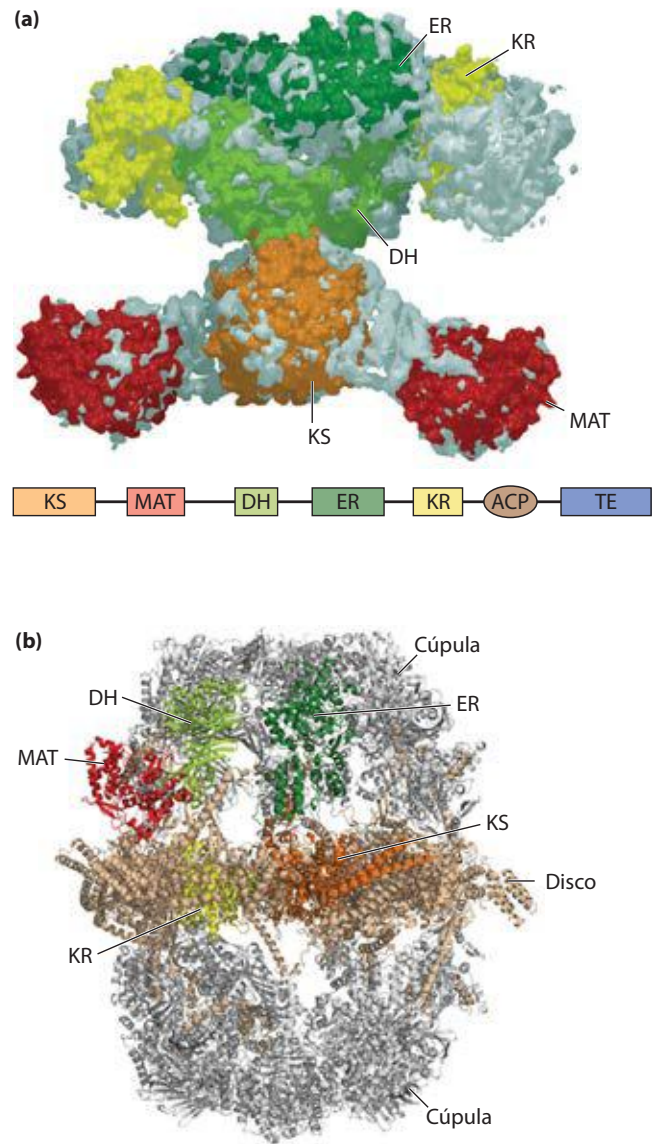



**FIGURA 21-3 A estrutura do sistema da ácido graxo-sintase tipo I.** Mostradas aqui são estruturas em baixa resolução dos sistemas enzimáticos (a) de mamífero (suíno; dímero derivado do PDB ID 2CF2) e (b) de fungo (derivado do PDB IDs 2UV9, 2UVA, 2UVB e 2UVC). **(a)** Todos os sítios ativos no sistema de mamíferos estão localizados em diferentes domínios de uma única e longa cadeia polipeptídica. As atividades enzimáticas distintas são: $\beta$-cetoacil-ACP-sintase (KS), malonil/acetil-CoA-ACP-transferase (MAT), $\beta$--hidroxiacil-ACP-desidratase (DH), enoil-ACP-redutase (ER) e $\beta$-cetoacil-ACP--redutase (KR). ACP é a proteína carreadora de grupos acila. O arranjo linear dos domínios no polipeptídeo está representado no painel mais abaixo. O sétimo domínio (TE) é uma tioesterase que libera o palmitato produzido pela ACP quando a síntese é finalizada. Os domínios ACP e TE estão desordenados na estrutura cristalina e, consequentemente, não estão mostrados nesta estrutura. **(b)** Na estrutura AGS I do fungo *Thermomyces lanuginosus*, os mesmos sítios ativos são divididos entre duas cadeias polipetídicas multifuncionais que atuam em conjunto. Seis cópias de cada polipeptídeo são encontradas no complexo heterododecamérico. Um disco de seis subunidades $\beta$, que inclui ACP, assim como os sítios ativos KS e KR, é encontrado no centro do complexo. No disco, três subunidades são encontradas em uma face, e três na outra. Nos dois lados do disco são formadas cúpulas por trímeros de subunidades $\beta$ (contendo os sítios ativos ER e DH, assim como dois domínios com sítios ativos análogos a MAT na enzima de mamíferos). Os domínios de um de cada tipo de subunidade estão coloridos de acordo com as cores dos sítios ativos da enzima de mamíferos em (a).

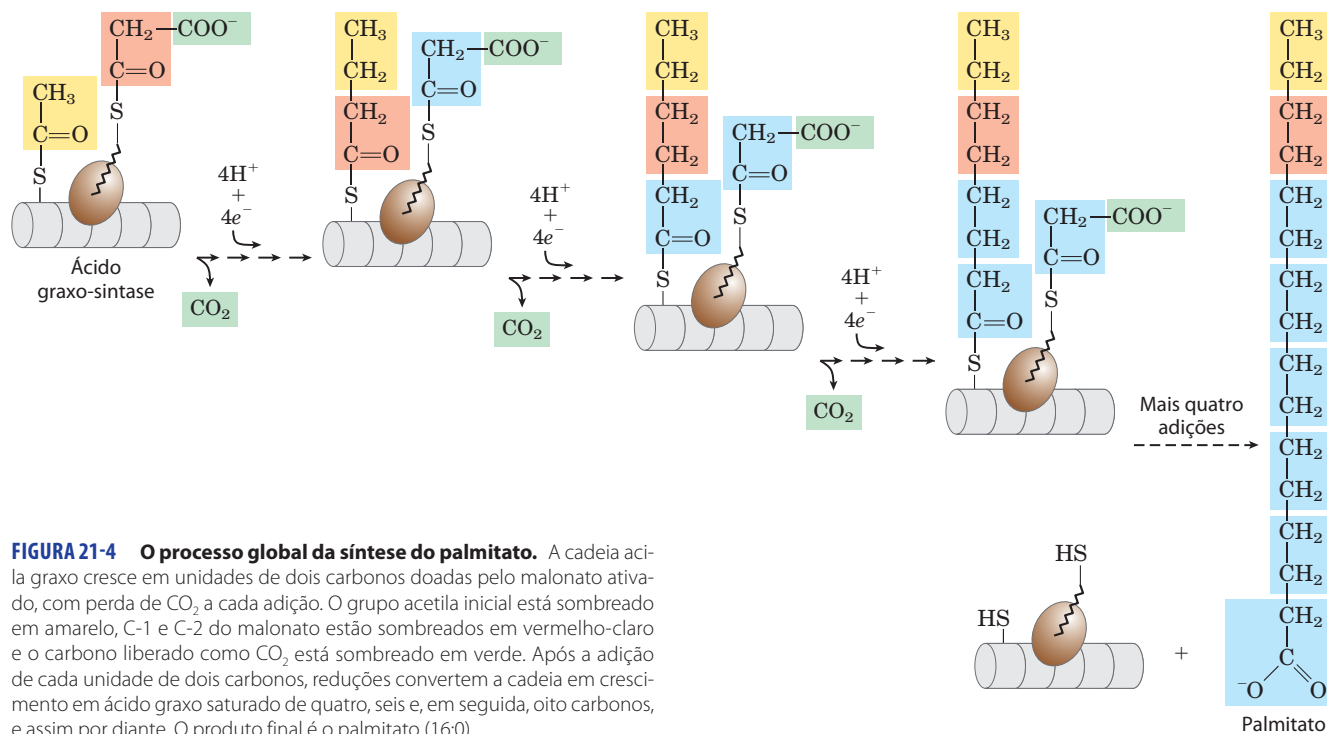



**FIGURA 21-4 O processo global da síntese do palmitato.** A cadeia acila graxo cresce em unidades de dois carbonos doadas pelo malonato ativado, com perda de $CO_2$ a cada adição. O grupo acetila inicial está sombreado em amarelo, C-1 e C-2 do malonato estão sombreados em vermelho-claro e o carbono liberado como $CO_2$ está sombreado em verde. Após a adição de cada unidade de dois carbonos, reduções convertem a cadeia em crescimento em ácido graxo saturado de quatro, seis e, em seguida, oito carbonos, e assim por diante. O produto final é o palmitato (16:0).

ma é encontrado em um domínio separado dentro do polipeptídeo maior. Ao longo do processo de síntese dos ácidos graxos, os intermediários permanecem covalentemente ligados como tioésteres a um de dois grupos tiol. Um ponto de ligação é o grupo —SH de um resíduo de Cys em um dos domínios da sintase ($\beta$-cetoacil-ACP-sintase; KS); o outro ponto é o grupo —SH de uma proteína transportadora de grupos acila, domínio distinto do mesmo polipeptídeo. A hidrólise dos tioésteres é altamente exergônica, e a energia liberada ajuda a tornar termodinamicamente favoráveis dois passos distintos (❶ e ❺ na Figura 21-6) da síntese dos ácidos graxos (condensação).

A **proteína transportadora de grupos acila** (**ACP**, do inglês *acyl carrier protein*) é o transportador que mantém o sistema unido. A ACP de *Escherichia coli* é uma proteína pequena ($M_r$ 8.860) contendo o grupo prostético **4′-fosfopanteteína** (**Figura 21-5**; compare esse grupo com o ácido pantotênico e com a porção $\beta$-mercaptoetilamina da coenzima A na Figura 8-38). Acredita-se que o grupo prostético 4′-fosfopanteteína da ACP de *E. coli* atue como um braço flexível, segurando a cadeia acila do ácido graxo em crescimento unida à superfície do complexo da ácido graxo-sintase enquanto transporta os intermediários da reação do sítio ativo de uma enzima para a próxima. A ACP de mamíferos tem função semelhante e o mesmo grupo prostético; como foi visto, no entanto, ela está inserida como um domínio em um polipeptídeo multifuncional muito maior.

**FIGURA 21-5 A proteína transportadora de grupos acila (ACP).** O grupo prostético é a 4′-fosfopanteteína, covalentemente ligada ao grupo hidroxila de um resíduo de Ser da ACP. A fosfopanteteína contém ácido pantotênico, uma vitamina do complexo B, também encontrada na molécula da coenzima A. Seu grupo —SH é o local de entrada de grupos malonila durante a síntese dos ácidos graxos.

## A ácido graxo-sintase recebe grupos acetila e malonila

Antes que as reações de condensação que constroem a cadeia do ácido graxo possam iniciar, os dois grupos tióis do complexo enzimático devem ser carregados com os grupamentos acila corretos (**Figura 21-6**, parte superior). Pri-

Cadeia lateral da Ser
Ácido pantotênico
4′-Fosfopanteteína
Grupos malonila são esterificados ao grupo —SH.

**FIGURA 21-6 Sequência de eventos durante a síntese dos ácidos graxos.** O complexo AGS I de mamíferos está representado esquematicamente, com os domínios catalíticos coloridos como na Figura 21-3. Cada domínio da longa cadeia polipeptídica representa uma das seis atividades enzimáticas do complexo, organizadas em uma grande forma de S apertado. A proteína transportadora de grupos acila (ACP) não está resolvida na estrutura cristalográfica mostrada na Figura 21-3, mas está acoplada ao domínio KS. O braço fosfopanteteína da ACP termina em um grupo —SH. Após o primeiro painel, a enzima colorida é a que agirá na etapa seguinte. Como na Figura 21-4, o grupo acetil inicial está sombreado em amarelo, C-1 e C-2 do malonato estão sombreados em cor salmão, e o carbono liberado como $CO_2$ está sombreado em verde. As etapas ❶ a ❹ estão descritas no texto.

meiramente, o grupo acetila da acetil-CoA é transferido para a ACP, em uma reação catalisada pelo domínio **malonil/acetil-CoA-ACP-transferase** (MAT na Figura 21-6) do polipeptídeo multifuncional. O grupo acetila é, então, transferido para o grupo —SH da Cys da **$\beta$-cetoacil-ACP--sintase** (KS). A segunda reação, a transferência do grupo malonila da malonil-CoA para o grupo —SH da ACP, também é catalisada pela malonil/acetil-CoA-ACP-transferase. No complexo sintase carregado, os grupos acetila e malonila são ativados para o processo de alongamento da cadeia. As primeiras quatro etapas desse processo serão consideradas agora em detalhes; os números das etapas referem-se à Figura 21-6.

**Etapa ❶ Condensação** A primeira reação na formação da cadeia de um ácido graxo é uma condensação de Claisen clássica envolvendo os grupos acetila e malonila ativados, formando **acetoacetil-ACP**, grupo acetoacetil ligado à ACP pelo grupo —SH da fosfopanteteína; simultaneamente, uma molécula de $CO_2$ é produzida. Nesta reação, catalisada pela $\beta$-cetoacil-ACP-sintase, o grupamento acetil é transferido do grupo —SH da Cys da enzima para o grupo malonila ligado ao grupo —SH da ACP, tornando-se a unidade de dois carbonos metil-terminal do novo grupo acetoacetila.

O átomo de carbono do $CO_2$ formado nessa reação é o mesmo carbono originalmente introduzido na malonil-CoA a partir do $HCO_3^-$ pela reação da acetil-CoA-carboxilase (Figura 21-1). Assim, a ligação covalente do $CO_2$ durante a biossíntese dos ácidos graxos é apenas transitória; ele é removido assim que cada unidade de dois carbonos é adicionada.

Por que as células têm o trabalho de adicionar $CO_2$ para formar o grupo malonila a partir do grupo acetila apenas para perder o $CO_2$ durante a formação de acetoacetato? O uso de grupos malonila ativados em vez de grupos acetil é o que torna as reações de condensação termodinamicamente favoráveis. O carbono metileno (C-2) do grupo malonila, situado entre os carbonos da carbonila e da carboxila, forma um bom nucleófilo. Na etapa de condensação (etapa ❶), a descarboxilação do grupo malonila facilita o ataque nucleofílico do carbono metileno sobre a ligação tioéster entre o grupo acetil e a $\beta$-cetoacil-ACP-sintase, deslocando o grupo —SH da enzima. (Essa é uma condensação de Claisen clássica; ver Figura 13-4.) O acoplamento da condensação à descarboxilação do grupo malonila torna o processo global altamente exergônico. Uma sequência semelhante de carboxilação-descarboxilação facilita a formação de fosfoenolpiruvato a partir de piruvato na gliconeogênese (ver Figura 14-18).

Por meio do uso de grupos malonila ativados na síntese dos ácidos graxos e de acetato ativado em sua degradação, a célula torna os dois processos termodinamicamente favoráveis, apesar de um ser efetivamente o inverso do outro. A energia extra necessária para tornar a síntese dos ácidos graxos favorável é fornecida pelo ATP utilizado na síntese de malonil-CoA a partir de acetil-CoA e $HCO_3^-$ (Figura 21-1).

**Etapa ❷ Redução do grupo carbonila** A acetoacetil-ACP formada na etapa de condensação sofre agora redução do grupo carbonil em C-3, formando D-$\beta$-hidroxibutiril-ACP. Essa reação é catalisada pela **$\beta$-cetoacil-ACP-redutase** (KR) e o doador de elétrons é o NADPH. Observe que o grupo D-$\beta$-hidroxibutiril não tem a mesma forma estereoisomérica que o intermediário L-$\beta$-hidroxiacil na oxidação dos ácidos graxos (ver Figura 17-8).

**Etapa ❸ Desidratação** Os elementos da água são agora removidos dos carbonos C-2 e C-3 da D-$\beta$-hidroxibutiril-ACP, formando uma ligação dupla no produto, ***trans*-$\Delta^2$-butenoil-ACP**. A enzima que catalisa essa desidratação é a **$\beta$-hidroxiacil-ACP-desidratase** (DH).

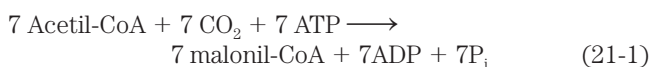
**Etapa ❹ Redução da ligação dupla** Finalmente, a ligação dupla da *trans*-$\Delta^2$-butenoil-ACP é reduzida (saturada), formando **butiril-ACP** pela ação da enzima **enoil-ACP-redutase** (ER); mais uma vez, NADPH é o doador de elétrons.

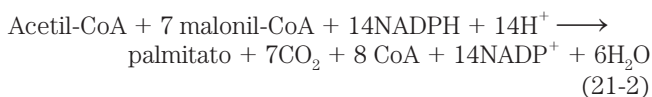
## As reações da ácido graxo-sintase são repetidas para formar palmitato

A produção de acil-ACP saturada, com quatro carbonos, marca a conclusão de uma rodada por meio do complexo da ácido graxo-sintase. Na etapa ❺, o grupo butirila é transferido do grupo —SH da fosfopanteteína da ACP para o grupo —SH de uma Cys da $\beta$-cetoacil-ACP-sintase, que sustentará inicialmente o grupo acetil (Figura 21-6). Para dar início ao próximo ciclo de quatro reações que alonga a cadeia em mais dois átomos de carbono (etapa ❻), outro grupo malonila liga-se ao grupo —SH da fosfopanteteína da ACP, agora desocupado (**Figura 21-7**). A condensação ocorre à medida que o grupo butirila, atuando como o grupo acetil no primeiro ciclo, é ligado aos dois átomos de carbono do grupo malonil-ACP, com a consequente perda de $CO_2$. O produto dessa condensação é um grupo acila com seis carbonos, covalentemente ligado ao grupo —SH da fosfopanteteína. Seu grupo $\beta$-cetônico é reduzido nas três etapas seguintes do ciclo da sintase, formando o grupo acila saturado, exatamente como no primeiro ciclo de reações – neste caso formando o produto de seis carbonos.

Sete ciclos de condensação e redução produzem o grupo palmitoila de 16 carbonos saturados, ainda ligado à ACP. Por razões ainda não bem compreendidas, o alongamento da cadeia pelo complexo da sintase geralmente é interrompido neste ponto e o palmitato é liberado da ACP pela ação de uma atividade hidrolítica (tioesterase; TE) da proteína multifuncional.

É possível considerar em duas etapas a reação global para a síntese do palmitato a partir de acetil-CoA. Primeiro, a formação de sete moléculas de malonil-CoA:

$$7 \text{ Acetil-CoA} + 7\, CO_2 + 7 \text{ ATP} \longrightarrow 7 \text{ malonil-CoA} + 7\text{ADP} + 7P_i \qquad (21\text{-}1)$$

em seguida, sete ciclos de condensação e redução:

$$\text{Acetil-CoA} + 7 \text{ malonil-CoA} + 14\text{NADPH} + 14H^+ \longrightarrow \text{palmitato} + 7CO_2 + 8 \text{ CoA} + 14\text{NADP}^+ + 6H_2O \qquad (21\text{-}2)$$

Observe que apenas seis moléculas de água são produzidas, porque uma é utilizada para hidrolisar a ligação tioéster en-

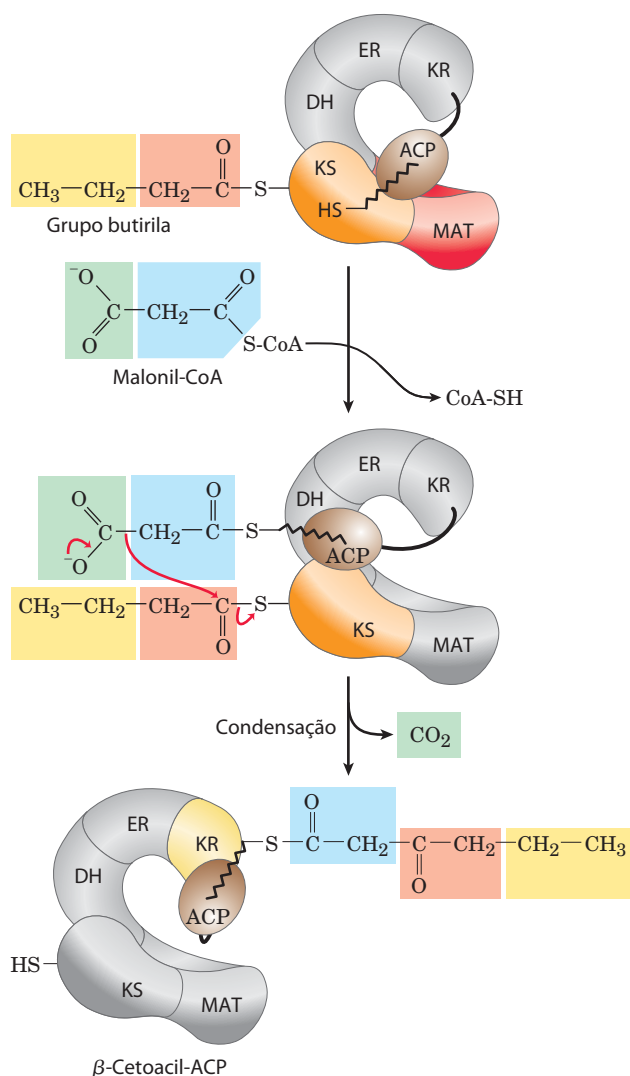
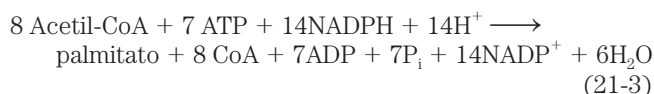



**FIGURA 21-7 Início da segunda rodada do ciclo da síntese dos ácidos graxos.** O grupo butirila está ligado ao grupo —SH da Cys. O grupo malonila que está entrando é primeiro acoplado ao grupo —SH da fosfopanteteína. A seguir, na etapa de condensação, todo o grupo butirila ligado ao —SH da Cys é trocado pelo grupo carboxila do resíduo de malonila, que é perdida como $CO_2$ (em verde). Esta etapa é análoga à etapa ❶ na Figura 21-6. O produto, um grupo $\beta$-cetoacila de seis carbonos, contém agora quatro carbonos derivados da malonil-CoA e dois derivados da acetil-CoA que iniciou a reação. O grupo $\beta$-cetoacila passa então pelas etapas ❷ a ❹, como na Figura 21-6.

tre o produto palmitato e a enzima. O processo global (a soma das Equações 21-1 e 21-2) é

$$8 \text{ Acetil-CoA} + 7 \text{ ATP} + 14\text{NADPH} + 14\text{H}^+ \longrightarrow \text{palmitato} + 8 \text{ CoA} + 7\text{ADP} + 7\text{P}_i + 14\text{NADP}^+ + 6\text{H}_2\text{O} \quad (21\text{-}3)$$

Assim, a biossíntese dos ácidos graxos como o palmitato requer acetil-CoA e o fornecimento de energia química de duas formas: o potencial de transferência de grupos do ATP e o poder redutor do NADPH. O ATP é necessário para ligar o $CO_2$ à acetil-CoA formando malonil-CoA; as moléculas de NADPH são necessárias para reduzir o grupo $\alpha$-ceto e a ligação dupla.

Em eucariotos não fotossintéticos existe um custo adicional para a síntese dos ácidos graxos, já que a acetil-CoA é gerada na mitocôndria e deve ser transportada para o citosol. Como será visto, essa etapa extra consome dois ATP por molécula de acetil-CoA transportada, aumentando o custo energético da síntese dos ácidos graxos para três ATP por unidade de dois carbonos.

## A síntese de ácidos graxos ocorre no citosol de muitos organismos, mas nos cloroplastos das plantas

Na maioria dos eucariotos superiores, o complexo da ácido graxo-sintase é encontrado exclusivamente no citosol (**Figura 21-8**), assim como as enzimas biossintéticas dos nucleotídeos, dos aminoácidos e da glicose. Esta localização segrega os processos sintéticos das reações de degradação, uma vez que muitas delas ocorrem na matriz mitocondrial. Existe uma separação correspondente dos cofatores transportadores de elétrons utilizados no anabolismo (geralmente processos redutivos) e aqueles utilizados no catabolismo (geralmente oxidativos).

Em geral, o NADPH é o transportador de elétrons para as reações anabólicas e o $NAD^+$ atua nas reações catabólicas. No citosol de hepatócitos, a relação [NADPH]/[$NADP^+$] é muito alta (aproximadamente 75), gerando um ambiente fortemente redutor para a síntese redutora dos ácidos graxos e de outras biomoléculas. A relação citosólica [NADH]/[$NAD^+$] é muito menor (apenas cerca de $8 \times 10^{-4}$), de modo que o catabolismo oxidativo da glicose, dependente de $NAD^+$, pode ocorrer no mesmo compartimento e ao mesmo tempo que a síntese dos ácidos graxos. A relação [NADH]/[$NAD^+$] é muito maior na mitocôndria do que no citosol, devido ao fluxo de elétrons para o $NAD^+$ a partir da oxidação de ácidos graxos, aminoácidos, piruvato e acetil-CoA. Essa relação alta entre [NADH]/[$NAD^+$] na mitocôndria favorece a redução do oxigênio pela cadeia respiratória.

Nos hepatócitos e adipócitos, NADPH citosólico é amplamente gerado pela via das pentoses-fosfato (ver Figura 14-22) e pela **enzima málica** (**Figura 21-9a**). Já a enzima málica ligada ao NADP, que opera na via de fixação do carbono em plantas $C_4$ (ver Figura 20-23), tem uma função diferente. O piruvato produzido na reação representada na Figura 21-9a entra novamente na mitocôndria. Nos hepatócitos e em glândulas mamárias de animais lactentes, o NADPH necessário para a biossíntese dos ácidos graxos é fornecido principalmente pela via das pentoses-fosfato (Figura 21-9b).

Nas células fotossintéticas dos vegetais, a síntese dos ácidos graxos não ocorre no citosol e sim no estroma dos cloroplastos (Figura 21-8). Isso faz sentido, já que o NADPH é produzido nos cloroplastos pelas reações dependentes de luz da fotossíntese:

$$H_2O + NADP^+ \xrightarrow{\text{luz}} \tfrac{1}{2}O_2 + NADPH + H^+$$

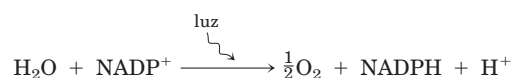
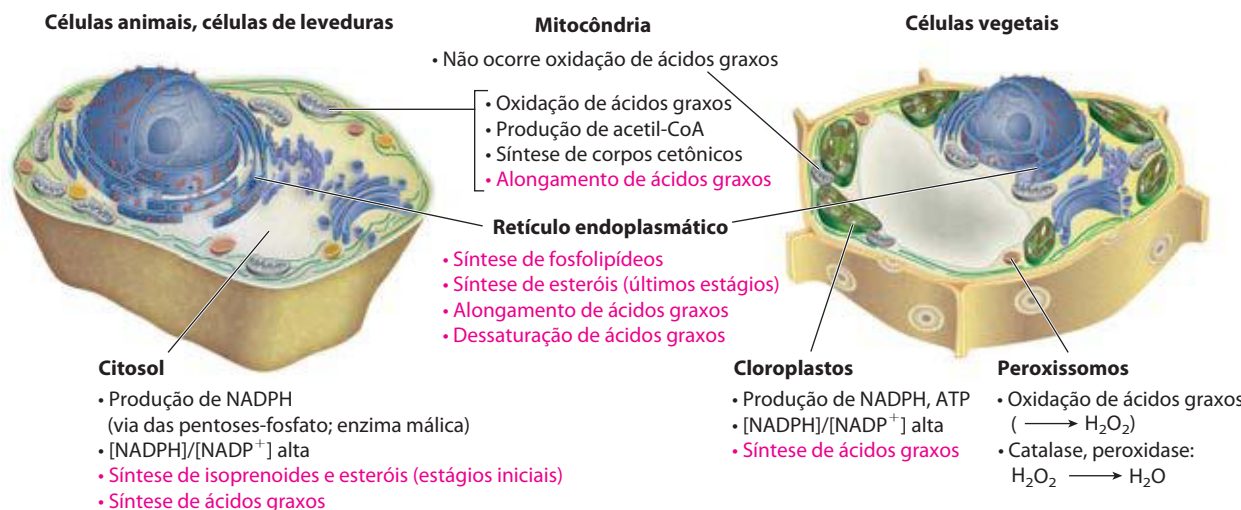



**FIGURA 21-8 Localização subcelular do metabolismo lipídico.** As células de leveduras e de vertebrados diferem das células dos vegetais superiores na compartimentalização do metabolismo lipídico. A síntese dos ácidos graxos ocorre em compartimentos em que NADPH está disponível para a síntese redutora (ou seja, onde a relação [NADPH]/[$NADP^+$] é alta); o citosol nos animais e nas leveduras, e os cloroplastos nas plantas. Os processos escritos em vermelho são descritos neste capítulo.

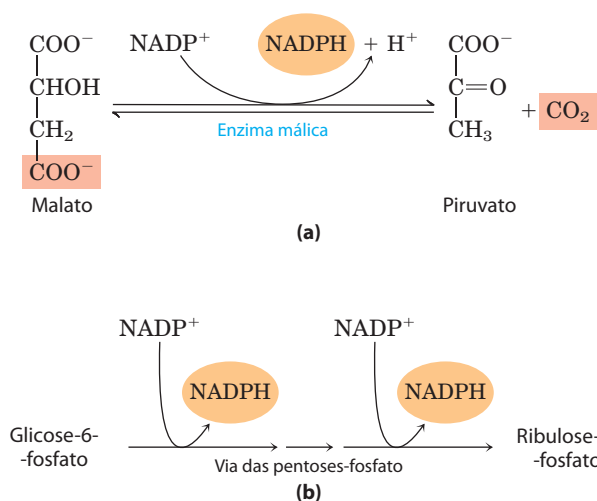



**FIGURA 21-9 Produção de NADPH.** Duas vias para a produção de NADPH catalisada pela **(a)** enzima málica e **(b)** via das pentoses-fosfato.

## O acetato é transportado para fora da mitocôndria como citrato

Em eucariotos não fotossintéticos, praticamente toda a acetil-CoA utilizada na síntese dos ácidos graxos é formada na mitocôndria a partir da oxidação do piruvato e do catabolismo dos esqueletos de carbono dos aminoácidos. A acetil-CoA gerada da oxidação dos ácidos graxos não é uma fonte significativa de acetil-CoA para a biossíntese dos ácidos graxos em animais, pelo fato de que as duas vias são reciprocamente reguladas, como descrito a seguir.

A membrana interna da mitocôndria é impermeável a acetil-CoA, de modo que um transportador indireto transfere os equivalentes do grupo acetila pela membrana interna (**Figura 21-10**). A acetil-CoA intramitocondrial reage primeiro com oxaloacetato formando citrato, uma reação do ciclo do ácido cítrico catalisada pela enzima **citrato-sintase** (ver Figura 16-7). O citrato, então, atravessa a membrana interna pelo **transportador de citrato**. No citosol, a clivagem do citrato pela **citrato-liase** regenera acetil-CoA e oxaloacetato em uma reação dependente de ATP. O oxaloacetato não pode retornar à matriz mitocondrial diretamente, já que não existe um transportador de oxaloacetato. Em vez disso, a malato-desidrogenase citosólica reduz o oxaloacetato a malato, o qual pode retornar à matriz mitocondrial pelo transportador malato-$\alpha$-cetoglutarato na troca por citrato. Na matriz, o malato é reoxidado a oxaloacetato, completando o ciclo. No entanto, a maior parte do malato produzido no citosol é utilizada para gerar NADPH citosólico pela ação da enzima málica (Figura 21-9a). O piruvato produzido é transportado para a mitocôndria pelo transportador de piruvato (Figura 21-10), sendo convertido em oxaloacetato na matriz, pela enzima piruvato-carboxilase. O ciclo resultante consome dois ATP (pela citrato-liase e pela piruvato-carboxilase) para cada molécula de acetil-CoA entregue para a síntese de ácidos graxos. Após a clivagem do citrato para gerar acetil-CoA, a conversão dos quatro carbonos remanescentes em piruvato e $CO_2$ pela enzima málica gera aproximadamente a metade do NADPH necessário para a síntese de ácidos graxos. A via das pentoses-fosfato fornece o restante de NADPH necessário.

## A biossíntese de ácidos graxos é precisamente regulada

Quando uma célula ou um organismo tem combustível metabólico mais que suficiente para suprir suas necessidades energéticas, geralmente o excesso é convertido em ácido graxo e estocado como lipídeos, como os triacilgliceróis. A reação catalisada pela acetil-CoA-carboxilase é a etapa limitante na biossíntese de ácidos graxos, e essa enzima é um ponto importante de regulação. Nos vertebrados, o

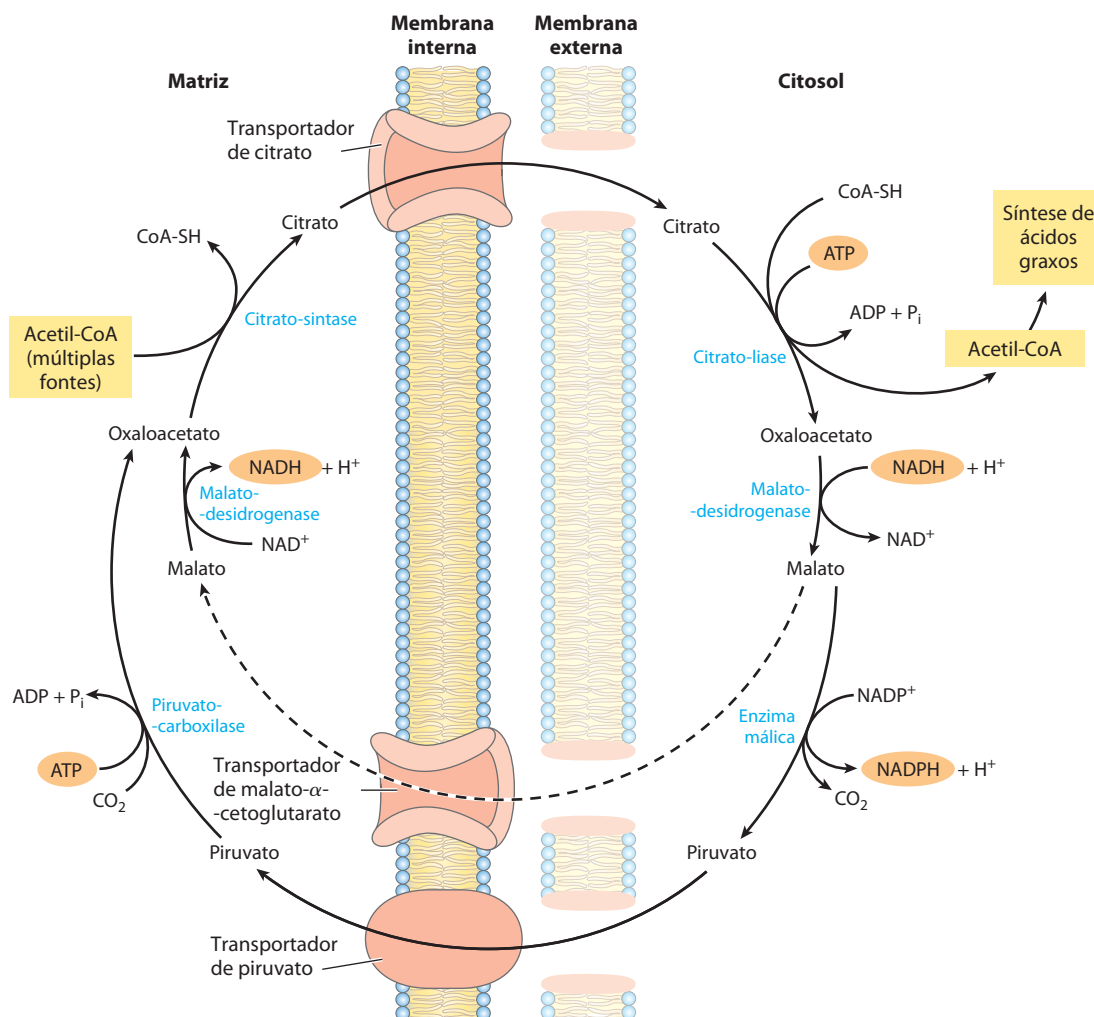



**FIGURA 21-10 Lançadeira para a transferência de grupos acetil da mitocôndria para o citosol.** A membrana mitocondrial externa é livremente permeável a todos esses compostos. O piruvato derivado do catabolismo dos aminoácidos na matriz mitocondrial ou da glicose por glicólise no citosol é convertido em acetil-CoA na matriz. Os grupos acetil saem da mitocôndria como citrato; no citosol, eles são liberados na forma de acetil-CoA para a síntese dos ácidos graxos. O oxaloacetato é reduzido a malato, que pode retornar à matriz mitocondrial, onde é convertido em oxaloacetato. O principal destino do malato citosólico é a oxidação pela enzima málica, gerando NADPH citosólico; o piruvato produzido retorna à matriz mitocondrial.

principal produto da síntese de ácidos graxos, a palmitoil-CoA, é um inibidor por retroalimentação dessa enzima; o citrato é um ativador alostérico (**Figura 21-11a**), elevando a $V_{máx}$. O citrato desempenha uma função central na alteração do metabolismo celular de consumo de combustível metabólico (oxidação) para o de armazenamento de combustível na forma de ácidos graxos. Quando as concentrações de acetil-CoA e ATP mitocondriais aumentam, o citrato é transportado para fora da mitocôndria; ele torna-se, então, tanto o precursor citosólico de acetil-CoA quanto um sinal alostérico para a ativação da acetil-CoA-carboxilase. Ao mesmo tempo, o citrato inibe a atividade da fosfofruto-cinase-1 (ver Figura 15-16), reduzindo o fluxo de carbono para a glicólise.

A acetil-CoA-carboxilase também é regulada por modificação covalente. A fosforilação promovida pelas ações dos hormônios glucagon e adrenalina inativa a enzima e reduz sua sensibilidade à ativação por citrato, dessa forma reduzindo a velocidade da síntese de ácidos graxos. Na sua forma ativa (desfosforilada), a acetil-CoA-carboxilase polimeriza-se em longos filamentos (Figura 21-11b); a fosforilação é acompanhada pela dissociação das subunidades monoméricas e perda da atividade.

A acetil-CoA-carboxilase de plantas e bactérias não é regulada por citrato ou por um ciclo de fosforilação-desfosforilação. A enzima vegetal é ativada por um aumento do pH do estroma e da $[Mg^{2+}]$, que ocorre com a iluminação da planta (ver Figura 20-17). As bactérias não utilizam triacilgliceróis para armazenar energia. Em *E. coli*, a principal função da síntese de ácidos graxos é fornecer precursores para a síntese de lipídeos de membrana; a regulação desse processo é complexa, envolvendo nucleotídeos da guanina (como ppGpp) que coordenam o crescimento celular com a formação da membrana (ver Figuras 8-39 e 28-22).

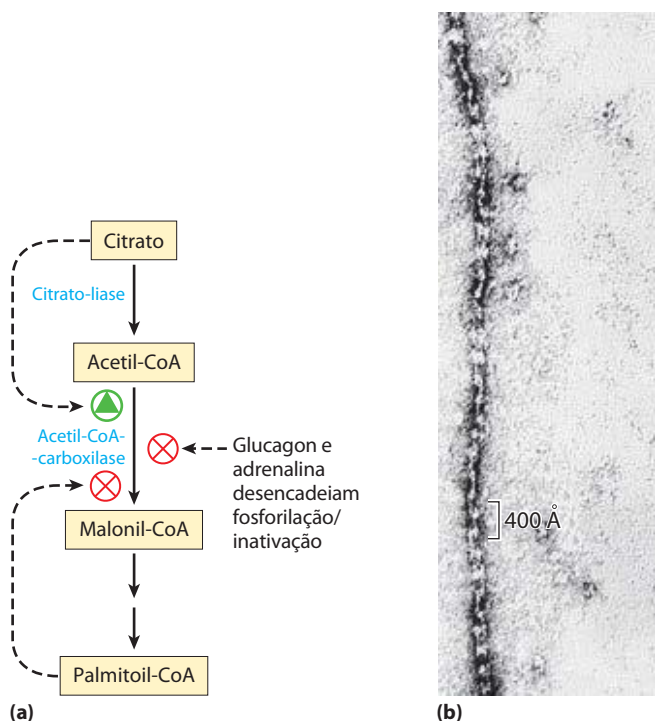



**FIGURA 21-11 Regulação da síntese dos ácidos graxos. (a)** Nas células de vertebrados, tanto a regulação alostérica como a modificação covalente dependente de hormônios influenciam o fluxo dos precursores para a formação de malonil-CoA. Nos vegetais, a acetil-CoA-carboxilase é ativada pelas variações na [$Mg^{2+}$] e no pH que acompanham a iluminação (não mostradas aqui). **(b)** Os filamentos da acetil-CoA-carboxilase de hepatócito de galinha (a forma ativa, desfosforilada) como vistos ao microscópio eletrônico.

**FIGURA 21-12 Vias de síntese de outros ácidos graxos.** O palmitato é o precursor do estearato e dos ácidos graxos saturados de cadeias mais longas, assim como dos ácidos graxos monoinsaturados palmitoleato e oleato. Os mamíferos são incapazes de converter oleato em linoleato ou em $\alpha$-linolenato (sombreado em cor salmão), que são, portanto, necessários na dieta como ácidos graxos essenciais. A conversão de linoleato em outros ácidos graxos poli-insaturados e em eicosanoides está representada nesta figura. Os ácidos graxos insaturados são simbolizados pela indicação do número de carbonos e do número e posição de ligações duplas, como na Tabela 10-1.

Além da regulação momento a momento da atividade enzimática, essas vias são reguladas no que se refere à expressão gênica. Por exemplo, quando os animais ingerem um excesso de certos ácidos graxos poli-insaturados, a expressão de genes que codificam uma série de enzimas lipogênicas no fígado é suprimida. A regulação desses genes é mediada por uma família de receptores proteicos nucleares chamados PPAR, descritos em maior detalhe no Capítulo 23 (ver Figura 23-42).

Se a síntese de ácidos graxos e a $\beta$-oxidação ocorressem simultaneamente, os dois processos constituiriam um ciclo fútil, desperdiçando energia. Já foi visto (ver Figura 17-13) que a $\beta$-oxidação é bloqueada por malonil-CoA, que inibe a enzima carnitina-aciltransferase I. Assim, durante a síntese de ácidos graxos, a produção do primeiro intermediário, a malonil-CoA, desliga a $\beta$-oxidação no nível do sistema transportador na membrana interna da mitocôndria. Esse mecanismo de controle ilustra outra vantagem da separação das vias sintéticas e degradativas em compartimentos celulares distintos.

## Os ácidos graxos saturados de cadeia longa são sintetizados a partir do palmitato

O palmitato, produto principal do sistema da ácido graxo-sintase nas células animais, é o precursor de outros ácidos graxos de cadeia longa (**Figura 21-12**). Ele deve ser alongado formando estearato (18:0) ou ácidos graxos saturados ainda maiores pela adição de grupos acetil, pela ação do **sistema de alongamento de ácidos graxos** presente no retículo endoplasmático (RE) liso e na mitocôndria. O sistema de alongamento mais ativo do RE alonga a cadeia de 16 carbonos da palmitoil-CoA em dois átomos de carbono, formando estearoil-CoA. Embora diferentes sistemas enzimáticos estejam envolvidos e a coenzima A seja o transportador de grupos acila, em lugar da ACP, o mecanismo de alongamento no RE é idêntico àquele utilizado na síntese do palmitato: doação de dois carbonos a partir da malonil-CoA, seguindo-se redução, desidratação e nova redução do produto saturado de 18 carbonos, a estearoil-CoA.

## A dessaturação dos ácidos graxos requer uma oxidase de função mista

O palmitato e o estearato servem como precursores dos dois ácidos graxos monoinsaturados mais comuns nos tecidos animais: o palmitoleato, 16:1($\Delta^9$) e o oleato, 18:1($\Delta^9$); os dois ácidos graxos contêm uma única ligação dupla *cis* entre C-9 e C-10 (ver Tabela 10-1). A ligação dupla é intro-

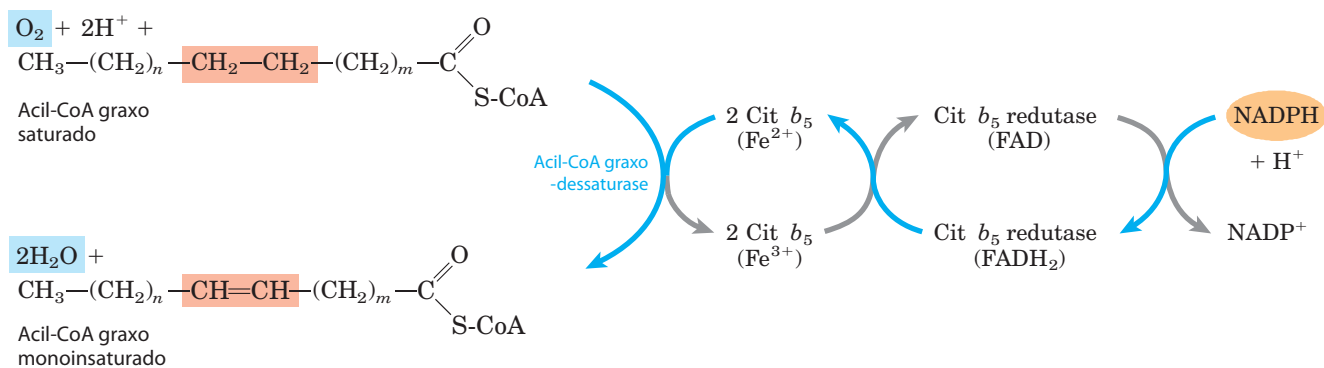



**FIGURA 21-13 Transferência de elétrons no processo de dessaturação dos ácidos graxos em vertebrados.** As setas azuis mostram o caminho dos elétrons na medida em que dois substratos diferentes – acil-CoA graxo e NADPH – são oxidados pelo oxigênio molecular. Essas reações ocorrem na face luminal do RE liso. Uma via semelhante, mas com transportadores de elétrons diferentes, ocorre em vegetais.

duzida na cadeia do ácido graxo por uma reação oxidativa catalisada pela **acil-CoA graxo-dessaturase** (**Figura 21-13**), uma **oxidase de função mista** (Quadro 21-1). Dois substratos diferentes, o ácido graxo e o NADPH, sofrem oxidação simultaneamente, perdendo dois elétrons. O caminho do fluxo dos elétrons inclui um citocromo (citocromo $b_5$) e uma flavoproteína (citocromo $b_5$-redutase), ambos localizados no RE liso, assim como a acil-CoA graxo-dessaturase. Nos vegetais, o oleato (18:1($\Delta^9$)) é produzido por uma **estearoil-ACP-dessaturase** (**EAD**) que utiliza a ferrodoxina reduzida como doadora de elétrons no estroma dos cloroplastos.

A EAD de animais (camundongos) tem um papel importante no desenvolvimento da obesidade e da resistência a insulina, que frequentemente acompanha a obesidade e precede o desenvolvimento de diabetes melito tipo 2. O camundongo tem quatro isoenzimas, EAD1 a EAD4, das quais EAD1 é a melhor entendida. Sua síntese é induzida por ácidos graxos saturados da dieta e também pela ação de SREBP e RHX, dois reguladores proteicos do metabolismo de lipídeos que ativam a transcrição de enzimas envolvidas na síntese de lipídeos (descrita na Seção 21.4). Camundongos contendo formas mutantes da EAD1 são resistentes a obesidade induzida pela dieta e não desenvolvem diabetes em condições que causariam tanto obesidade quanto diabetes em camundongos portadores de EAD1.

Os hepatócitos dos mamíferos podem facilmente introduzir ligação dupla na posição $\Delta^9$ dos ácidos graxos, mas não podem introduzir ligações duplas adicionais entre C-10 e a extremidade metila. Assim, os mamíferos não podem sintetizar linoleato, 18:2($\Delta^{9,12}$), ou $\alpha$-linolenato, 18:3($\Delta^{9,12,15}$). No entanto, os vegetais podem sintetizar ambos; as dessaturases que introduzem ligações duplas nas posições $\Delta^{12}$ e $\Delta^{15}$ estão localizadas no RE e nos cloroplastos. As enzimas do RE não atuam sobre ácidos graxos livres, mas sobre um fosfolipídeo, a fosfatidilcolina, que contém pelo menos um oleato ligado ao glicerol (**Figura 21-14**). Ambas, plantas e bactérias, devem sintetizar os ácidos graxos poli-insaturados para garantir a fluidez da membrana em temperaturas reduzidas.

Como eles são precursores necessários para a síntese de outros produtos, o linoleato e o $\alpha$-linolenato são

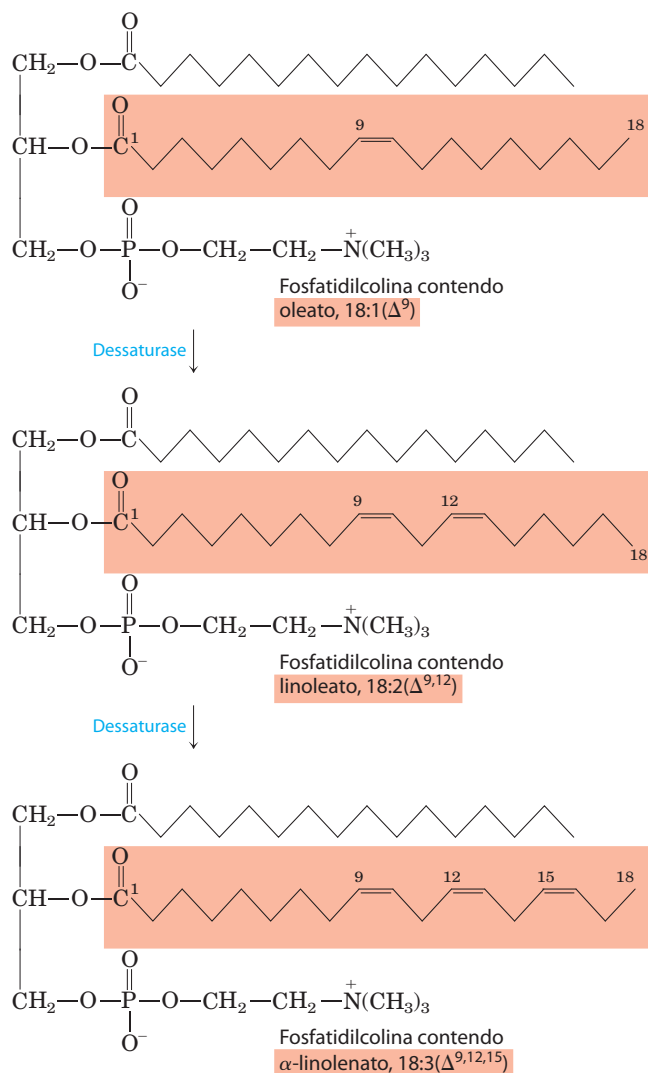



**FIGURA 21-14 Ação das dessaturases de vegetais.** Nas plantas, as dessaturases oxidam o oleato ligado à fosfatidilcolina, produzindo ácidos graxos poli-insaturados. Alguns dos produtos são liberados da fosfatidilcolina por hidrólise.

## QUADRO 21-1  MEDICINA Oxidases de função mista, enzimas do citocromo P-450 e *overdose* de drogas

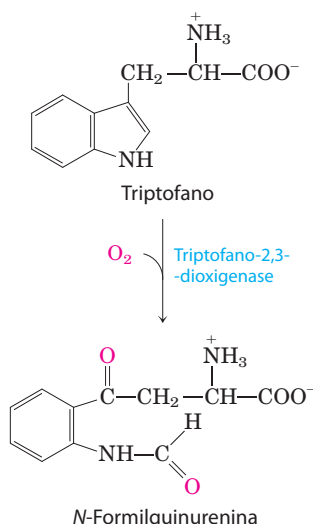
Neste capítulo são abordadas diversas enzimas que catalisam reações de oxidação-redução em que o oxigênio molecular é um participante. A estearoil-CoA dessaturase (EAD) que introduz uma ligação dupla em uma cadeia acil graxo (ver Figura 21-13) é uma dessas enzimas.

A nomenclatura das enzimas que catalisam as reações desse tipo frequentemente é confusa para os estudantes. **Oxidase** é o nome geral para enzimas que catalisam oxidações em que o oxigênio molecular é o receptor de elétrons, no entanto os átomos de oxigênio não aparecem no produto oxidado. A enzima que introduz uma ligação dupla na acil-CoA graxo durante a oxidação dos ácidos graxos nos peroxissomos (ver Figura 17-14) é uma oxidase desse tipo; um segundo exemplo é a citocromo-oxidase da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (ver Figura 19-14). No primeiro caso, a transferência de dois elétrons para $H_2O$ produz peróxido de hidrogênio, $H_2O_2$; no segundo, dois elétrons reduzem ½ $O_2$ a $H_2O$. Muitas oxidases são flavoproteínas, mas não todas elas.

As **oxigenases** catalisam reações oxidativas em que átomos de oxigênio *são* diretamente incorporados na molécula do produto, formando um novo grupo hidroxila ou carboxila, por exemplo. As **dioxigenases** catalisam reações em que os dois átomos de oxigênio do $O_2$ são incorporados na molécula do produto orgânico. Exemplo de dioxigenase é a triptofano-2,3-dioxigenase, que catalisa a abertura do anel de cinco membros do triptofano no catabolismo desse aminoácido. Quando essa reação ocorre na presença de $^{18}O_2$, o átomo de oxigênio isotópico é encontrado nos dois grupos carbonila do produto (mostrado em vermelho).

Triptofano

$O_2$ — Triptofano-2,3-dioxigenase

*N*-Formilquinurenina

As **monoxigenases**, mais comuns e mais complexas em suas ações, catalisam reações em que apenas um dos dois átomos de oxigênio do $O_2$ é incorporado no produto orgânico, o outro sendo reduzido a $H_2O$. As monoxigenases necessitam de dois substratos para funcionarem como redutores dos dois átomos de oxigênio do $O_2$. O substrato principal aceita um dos dois átomos de oxigênio e um cossubstrato fornece átomos de hidrogênio para reduzir o outro átomo de oxigênio a $H_2O$. A equação geral da reação para as monoxigenases é

$$AH + BH_2 + O{-}O \longrightarrow A{-}OH + B + H_2O$$

onde AH é o substrato principal e $BH_2$ é o cossubstrato. Como a maioria das monoxigenases catalisa reações em que o substrato principal torna-se hidroxilado, elas também são chamadas de **hidroxilases**. Algumas vezes também são chamadas de **oxidases de função mista** ou **oxigenases de função mista**, para indicar que oxidam dois substratos diferentes simultaneamente. (Observe aqui o uso de "oxidase", o qual viola a definição geral dada acima.)

Existem diferentes classes de monoxigenases, dependendo da natureza do cossubstrato. Algumas utilizam os nucleotídeos de flavina ($FMNH_2$ ou $FADH_2$); outras usam NADH ou NADPH; e há as que utilizam o $\alpha$-cetoglutarato como cossubstrato. A enzima que hidroxila o anel de fenila da fenilalanina, formando tirosina, é uma monoxigenase, para a qual a tetra-hidrobiopterina serve como cossubstrato (ver Figura 18-23). (Essa é a enzima defeituosa na doença genética humana chamada de fenilcetonúria.)

As mais numerosas e mais complexas reações de monoxigenação são aquelas que usam um tipo de hemeproteína chamada de **citocromo P-450**. Da mesma forma que a citocromo-oxidase mitocondrial, enzimas contendo um domínio citocromo P-450 podem reagir com $O_2$ e ligar monóxido de carbono, mas elas podem ser diferentes da citocromo-oxidase, já que o complexo das suas formas reduzidas com o monóxido de carbono exibe intensa absorção de luz a 450 nm – por isso o nome P-450.

As enzimas do citocromo P-450 catalisam reações de hidroxilação em que um substrato orgânico, RH, é hidroxilado a R—OH, incorporando um átomo de oxigênio do $O_2$; o outro átomo de oxigênio é reduzido a $H_2O$ pelos equivalentes redutores fornecidos pelo NADH ou pelo NADPH, mas que geralmente são transferidos para o citocromo P-450 por uma proteína ferro-enxofre. A Figura Q-1 mostra um esquema simplificado da ação do citocromo P-450.

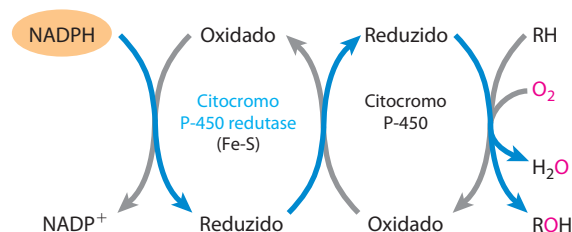



**FIGURA Q-1**

Existe uma grande família de proteínas contendo P-450 de dois tipos gerais: aquelas altamente específicas para um único substrato (como as enzimas típicas) e aquelas com sítios de ligação mais promíscuos que aceitam uma variedade de substratos, geralmente semelhantes na hidrofobicidade. No córtex da suprarrenal, por exemplo, um citocromo P-450 específico participa da hidroxilação de esteroides, gerando os hormônios adrenocorticais (ver Figura 21-49). Existem dúzias de enzimas contendo P-450 que atuam sobre substratos muito específicos nas vias biossintéticas dos hormônios esteroides e dos eicosanoides. As enzimas do citocromo P-450 com especificidades mais amplas são importantes na hidroxilação de muitas drogas distintas, como barbituratos e outros xenobióticos (substâncias estranhas ao organismo), particularmente se são hidrofóbicos e relativamente insolúveis. O carcinógeno ambiental benzo[*a*]pireno (encontrado na fumaça do cigarro) sofre hidroxilação dependente do citocromo P-450 durante sua destoxificação. A hidroxilação de xenobióticos, algumas vezes combinada com o acoplamento de um composto polar tal como o ácido glicurônico ao grupo hidroxila, os tornam mais solúveis em água e permite a sua excreção na urina. A hidroxilação (e a glicuronidação) inativa a maioria dos fármacos, e a velocidade com que isso ocorre determina por quanto tempo uma determinada dose de um fármaco permanece no sangue em doses terapêuticas. Os humanos diferem em seus níveis de enzimas de metabolização de farmácos por dois motivos: pela sua genética e o fato de que exposição prévia a substratos pode induzir a síntese de níveis maiores das enzimas P-450 em determinado indivíduo. O etanol e os barbitúricos compartilham uma enzima P-450. O consumo excessivo de álcool por longo prazo induz a síntese dessa enzima P-450. Como o barbiturato é inativado e eliminado mais rápido, são necessárias doses maiores da droga para alcançar o mesmo efeito terapêutico. Se um indivíduo ingerir essa dose de barbiturato maior que o comum e também ingerir álcool, a competição entre o álcool e o barbiturato pela quantidade limitada de enzima significa que tanto o álcool como o barbiturato serão eliminados mais lentamente. Os altos níveis resultantes desses dois depressores do sistema nervoso central podem ser letais. Complicações semelhantes surgem quando um indivíduo ingere dois fármacos que são inativados pela mesma enzima P-450; cada farmáco aumenta a dose efetiva da outra por reduzir sua inativação. Em consequência disso, é essencial para médicos e farmacêuticos conhecer sobre todos os medicamentos e suplementos prescritos a um paciente (assim como conhecer o histórico de alcoolismo, tabagismo ou exposição a toxinas ambientais).

As reações descritas neste capítulo catalisadas por oxidases de função mista são aquelas envolvidas na dessaturação de acil-CoA graxo (Figura 21-13), na síntese de leucotrienos (Figura 21-16), na síntese de plasmalogênios (Figura 21-30), na conversão de esqualeno em colesterol (Figura 21-37) e na síntese de hormônios esteroides (Figura 21-49).

**ácidos graxos essenciais** para os mamíferos; eles devem ser obtidos dos vegetais presentes na dieta. Uma vez ingerido, o linoleato pode ser convertido em alguns outros ácidos poli-insaturados, especialmente o $\gamma$-linolenato, o eicosatrienoato e o araquidonato (eicosatetraenoato), e todos eles podem ser formados apenas a partir do linoleato (Figura 21-12). O araquidonato, 20:4($\Delta^{5,8,11,14}$) é um precursor essencial de lipídeos regulatórios, os eicosanoides. Os ácidos graxos de 20 carbonos são sintetizados a partir do linoleato (e $\alpha$-linolenato) por reações de alongamento de ácidos graxos análogas àquelas descritas na página 842.

## Os eicosanoides são formados a partir de ácidos graxos poli-insaturados de 20 carbonos

Os eicosanoides são uma família de moléculas de sinalização biológica muito potente que atuam como mensageiros de curta distância, agindo sobre os tecidos próximos às células que os produzem. Em resposta a hormônios ou a outro estímulo, a fosfolipase $A_2$, presente na maioria dos tipos de células de mamíferos, ataca os fosfolipídeos de membrana, liberando araquidonato do carbono do meio do glicerol. As enzimas do RE liso, então, convertem o araquidonato em **prostaglandinas**, iniciando com a formação de prostaglandina $H_2$ ($PGH_2$), o precursor imediato de muitas outras prostaglandinas e de tromboxanos (**Figura 21-15a**). As duas reações que levam à $PGH_2$ são catalisadas por uma enzima bifuncional, a **cicloxigenase** (**COX**), também chamada de **prostaglandina $H_2$-sintase**. Na primeira das duas etapas, a atividade de cicloxigenase introduz oxigênio molecular convertendo araquidonato em $PGG_2$. A segunda etapa, catalisada pela atividade de peroxidase da COX, converte $PGG_2$ em $PGH_2$.

Os mamíferos têm duas isoenzimas da prostaglandina $H_2$-sintase, a COX-1 e a COX-2. Elas têm funções distintas, mas as sequências de aminoácidos são muito semelhantes (60 a 65% de identidade de sequência) e mecanismos de reação similares nos seus dois centros catalíticos. A COX-1 é responsável pela síntese das prostaglandinas que regulam a secreção da mucina gástrica, e a COX-2 pelas prostaglandinas que controlam inflamação, dor e febre.

A dor pode ser aliviada pela inibição da COX-2. O primeiro fármaco amplamente comercializado com esse propósito foi a aspirina (acetilsalicilato; Figura 21-15b). O nome aspirina (*a* de acetil e *spir* de *Spirsaüre*, a palavra alemã para os salicilatos preparados a partir da planta *Spiraea ulmaria*) apareceu em 1899 quando o fármaco foi introduzido no mercado pela companhia Bayer. A aspirina inativa irreversivelmente a atividade de cicloxigenase das

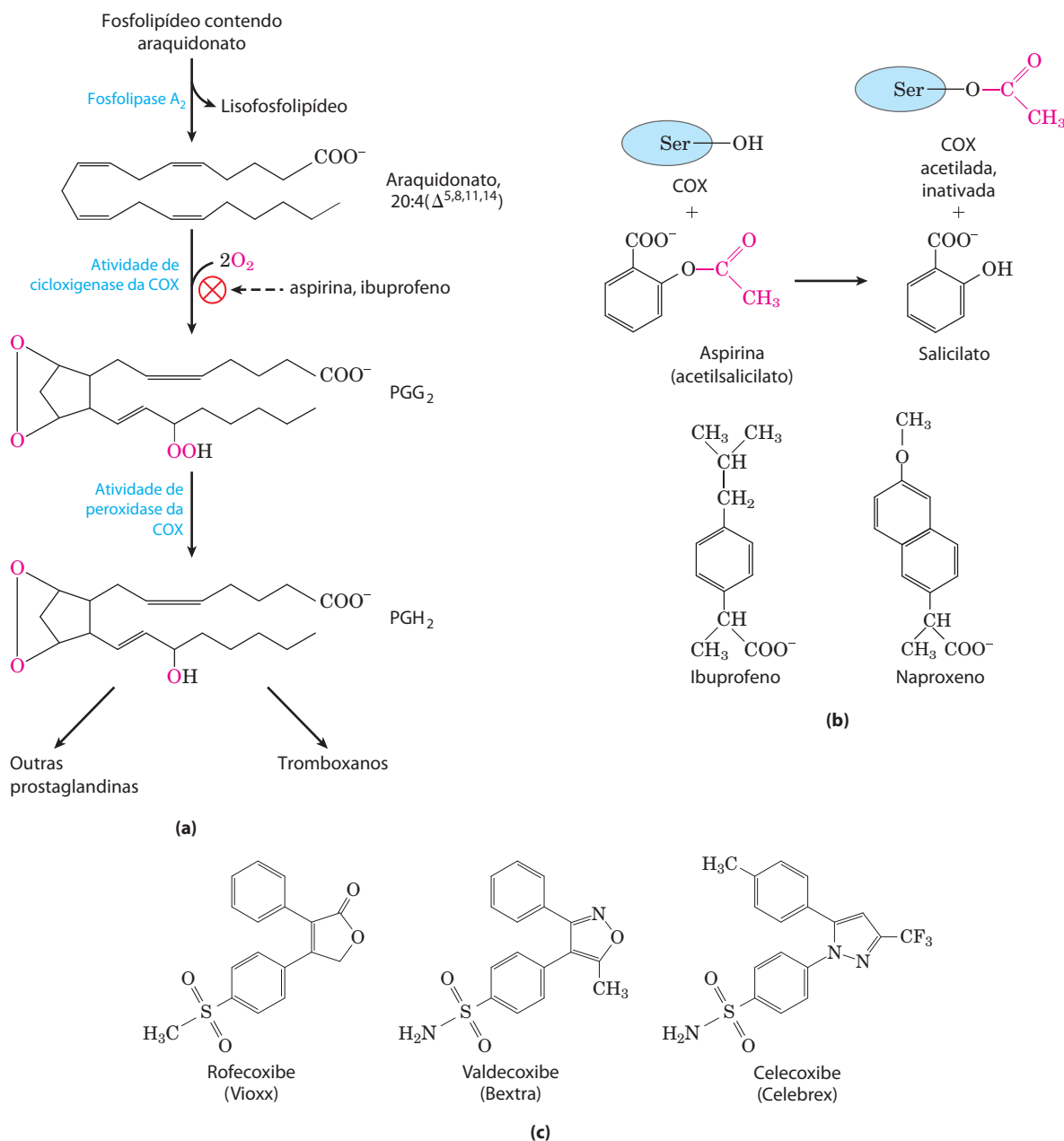



**FIGURA 21-15 A via "cíclica" do araquidonato até prostaglandinas e tromboxanos. (a)** Após a liberação do araquidonato dos fosfolipídeos pela ação da enzima fosfolipase $A_2$, as atividades de cicloxigenase e peroxidase da COX (também chamada de prostaglandina $H_2$-sintase) catalisam a produção de $PGH_2$, o precursor de outras prostaglandinas e tromboxanos. **(b)** A aspirina inibe a primeira reação da via, por acetilação de um resíduo de Ser essencial na enzima. O ibuprofeno e o naproxeno inibem a mesma etapa, provavelmente por mimetizarem a estrutura do substrato ou um intermediário da reação. **(c)** Os inibidores específicos da cicloxigenase COX-2 desenvolvidos para o alívio da dor (ver texto). O Vioxx foi retirado do mercado em 2004, e Bextra em 2005, devido aos seus efeitos colaterais no sistema cardiovascular.

duas isoenzimas da COX, por acetilar um resíduo de Ser, bloqueando os sítios ativos dessas enzimas. Consequentemente, a síntese de prostaglandinas e tromboxanos é inibida. O ibuprofeno, outro fármaco anti-inflamatório não esteroide (AINE; Figura 21-15b) amplamente utilizado, inibe o mesmo par de enzimas. No entanto, a inibição da COX-1 pode resultar em efeitos colaterais indesejáveis como irritação estomacal e condições ainda mais sérias. Na década de 1990, com a resolução da estrutura cristalográfica da COX-1 e da COX-2, foram desenvolvidos compostos AINE com maior especificidade para a COX-2, para uso em terapias avançadas de dores graves. Três desses fármacos foram aprovados para uso em todo mundo: rofecoxibe (Vioxx), valdecoxibe (Bextra) e celecoxibe (Celebrex) (Figura 21-15c). Lançados no final da década de 1990, os novos compostos foram, inicialmente, um sucesso para as indústrias farmacêuticas que os produziam. No entanto, o entusiasmo tornou-se preocupação quando artigos científicos e estudos clínicos ligaram o uso dos fármacos ao aumento no risco de ataque cardíaco e acidente vascular cerebral.

As razões para o problema ainda não estão claras, mas alguns pesquisadores especulam que os inibidores da COX-2 alteram o delicado balanço entre a produção do hormônio prostaciclina, que dilata os vasos sanguíneos, previne a coagulação sanguínea e é reduzida pelos inibidores da COX-2, e a produção de tromboxanos, gerados pela via envolvendo a COX-1, que ajuda a formar coágulos sanguíneos. O Vioxx foi retirado do mercado em 2004, e o Bextra foi retirado logo após. Desde o início de 2012, o Celebrex ainda está no mercado, mas está sendo usado com cuidado aumentado.

A **tromboxano-sintase**, presente nas plaquetas sanguíneas (trombócitos), converte $PGH_2$ em tromboxano $A_2$, do qual outros **tromboxanos** são derivados (Figura 21-15a). Os tromboxanos induzem a constrição dos vasos sanguíneos e a agregação plaquetária, etapas iniciais na coagulação sanguínea. Baixas doses de aspirina ingeridas regularmente reduzem a probabilidade de ataques cardíacos e de acidentes vasculares cerebrais pela redução da produção de tromboxanos. ■

Os tromboxanos, como as prostaglandinas, contêm um anel de cinco ou seis átomos; a via a partir do araquidonato que leva a essas duas classes de compostos é, algumas vezes, chamada de via "cíclica", para distingui-la da via linear que leva do araquidonato aos **leucotrienos**, que são compostos lineares (**Figura 21-16**). A síntese dos leucotrienos inicia com a ação de diversas lipoxigenases que catalisam a incorporação do oxigênio molecular ao araquidonato. Essas enzimas, encontradas em leucócitos, no coração, no cérebro, nos pulmões e no baço, são oxidases de função mista da família do citocromo P-450 (Quadro 21-1). Os diversos leucotrienos diferem na posição do grupo peróxido introduzido pelas lipoxigenases. Essa via linear a partir do araquidonato, ao contrário da via cíclica, não é inibida pela aspirina ou outros compostos AINE.

Os vegetais também produzem importantes moléculas de sinalização a partir dos ácidos graxos. Como nos animais, uma etapa-chave na iniciação da sinalização envolve a ativação de uma fosfolipase específica. Em plantas, o ácido graxo liberado e que funcionará como substrato é o $\alpha$-linolenato. Uma lipoxigenase catalisa, então, a primeira etapa de uma via que converte linolenato em jasmonato, uma substância conhecida por ter função de sinalização na defesa contra insetos, na resistência a patógenos fúngicos e na maturação do pólen. O jasmonato (ver Figura 12-33) também interfere na germinação das sementes, no crescimento das raízes e no desenvolvimento dos frutos e das sementes.

## RESUMO 21.1 Biossíntese de ácidos graxos e eicosanoides

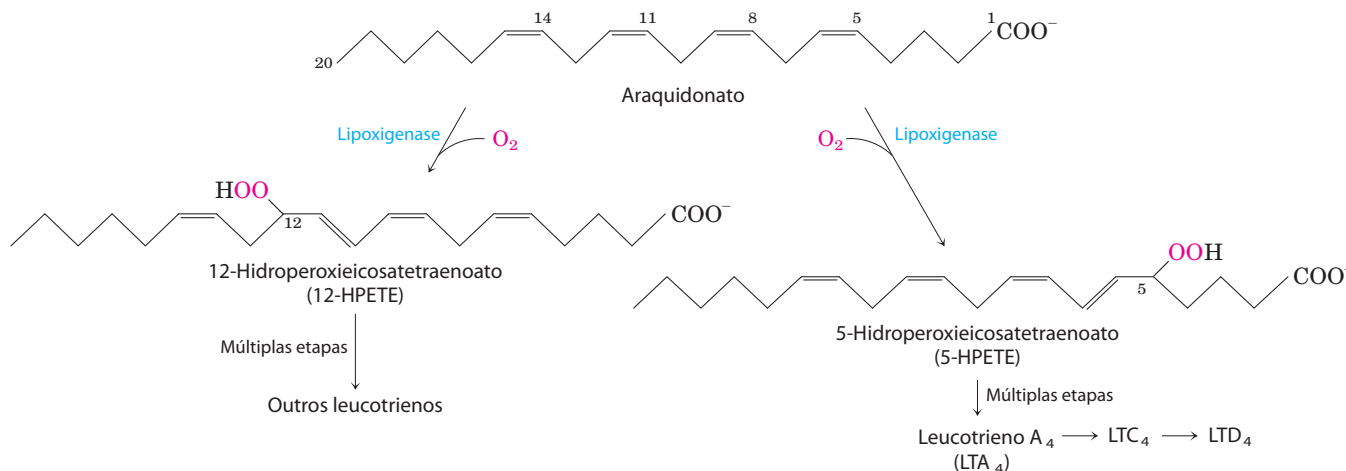
- Os ácidos graxos saturados de cadeia longa são sintetizados a partir de acetil-CoA por um sistema citosólico de seis atividades enzimáticas e uma proteína transportadora de grupos acila (ACP). Existem dois tipos de enzimas ácido graxo-sintase. A AGS I, encontrada em vertebrados e fungos, consiste em polipeptídeos multifuncionais. A AGS II é um sistema dissociado, encontrado em bactérias e plantas. Ambas contêm dois tipos de grupos —SH (fornecido pela fosfopanteteína da ACP, o outro por um resíduo de Cys da $\beta$-cetoacil-ACP-sintase) que funcionam como transportadores de intermediários acil graxo.
- Malonil-ACP, formado a partir de acetil-CoA (transportada para fora da mitocôndria) e $CO_2$, condensa-se com o grupo acetil ligado ao —SH da Cys, gerando acetoacetil-ACP, com a liberação de $CO_2$. Esta etapa é seguida por redução do derivado D-$\beta$-hidroxiacila, desidratação produzindo *trans*-$\Delta^2$-acil-ACP insaturada e redução a butiril-ACP. NADPH é o doador de elétrons para ambas as reduções. A síntese dos ácidos graxos é regulada na etapa de formação de malonil-CoA.
- Mais seis moléculas de malonil-ACP reagem sucessivamente na extremidade carboxila da cadeia do ácido graxo em crescimento, formando palmitoil-ACP – o produto final da reação da ácido graxo-sintase. O palmitato livre é liberado por hidrólise.
- O palmitato pode ser alongado a estearato, com 18 carbonos. Palmitato e estearato podem ser dessaturados, gerando palmitoleato e oleato, respectivamente, pela ação de oxidases de função mista.



**FIGURA 21-16 A via "linear" do araquidonato até os leucotrienos.**

- Os mamíferos não podem sintetizar linoleato e devem obtê-lo a partir de fontes vegetais; eles convertem o linoleato exógeno em araquidonato, o composto precursor dos eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), uma família de moléculas de sinalização muito potentes. A síntese das prostaglandinas e dos tromboxanos é inibida pelos AINE que atuam sobre a atividade de cicloxigenase da prostaglandina $H_2$-sintase.

## 21.2 Biossíntese de triacilgliceróis

A maior parte dos ácidos graxos sintetizados ou ingeridos por um organismo possui um de dois destinos: a incorporação em triacilgliceróis para o armazenamento de energia metabólica ou a incorporação nos componentes fosfolipídicos da membrana. A divisão entre esses destinos alternativos depende das necessidades momentâneas do organismo. Durante o crescimento rápido, a síntese de novas membranas requer a produção de fosfolipídeos de membrana; quando um organismo dispõe de suprimento abundante de alimento, mas não está crescendo ativamente, ele desvia a maior parte dos ácidos graxos para a síntese das gorduras de reserva. As duas vias iniciam no mesmo ponto: a formação de ésteres acil graxo de glicerol. Esta seção estuda a formação de triacilgliceróis e a sua regulação, bem como a produção de glicerol-3-fosfato no processo de gliceroneogênese.

### Os triacilgliceróis e os glicerofosfolipídeos são sintetizados a partir dos mesmos precursores

Os animais são capazes de sintetizar e estocar grandes quantidades de triacilgliceróis, para serem utilizados posteriormente como combustível (ver Quadro 17-1). Os humanos estocam apenas algumas centenas de gramas de glicogênio no fígado e nos músculos, quantidade suficiente apenas para suprir as necessidades energéticas do corpo por 12 horas. Por outro lado, a quantidade total de triacilglicerol armazenado em um homem de 70 kg de constituição média é de cerca de 15 kg, o suficiente para suprir as necessidades energéticas basais por aproximadamente 12 semanas (ver Tabela 23-5). Os triacilgliceróis dispõem do maior conteúdo energético de todos os nutrientes estocados – mais de 38 kJ/g. Sempre que os carboidratos são ingeridos em excesso à capacidade de armazenamento de glicogênio, esse excesso é convertido em triacilgliceróis e armazenado no tecido adiposo. Os vegetais também sintetizam triacilgliceróis como combustível rico em energia e eles são armazenados, principalmente, nos frutos, nas nozes e nas sementes.

Nos tecidos animais, os triacilgliceróis e os glicerofosfolipídeos, como a fosfatidiletanolamina, compartilham dois precursores (acil-CoA graxo e L-glicerol-3-fosfato) e diversas etapas biossintéticas. A grande maioria do glicerol-3-fosfato é derivada do intermediário glicolítico di-hidroxiacetona-fosfato (DHAP) pela ação da **glicerol-3-fosfato-desidrogenase** citosólica ligada ao NAD; no fígado e nos rins, uma pequena parte do glicerol-3-fosfato também é produzida a partir do glicerol pela ação da **glicerol-cinase** (**Figura 21-17**). Os outros precursores dos triacilgliceróis são acil-CoA graxos, formadas a partir dos ácidos graxos pelas **acil-CoA-**

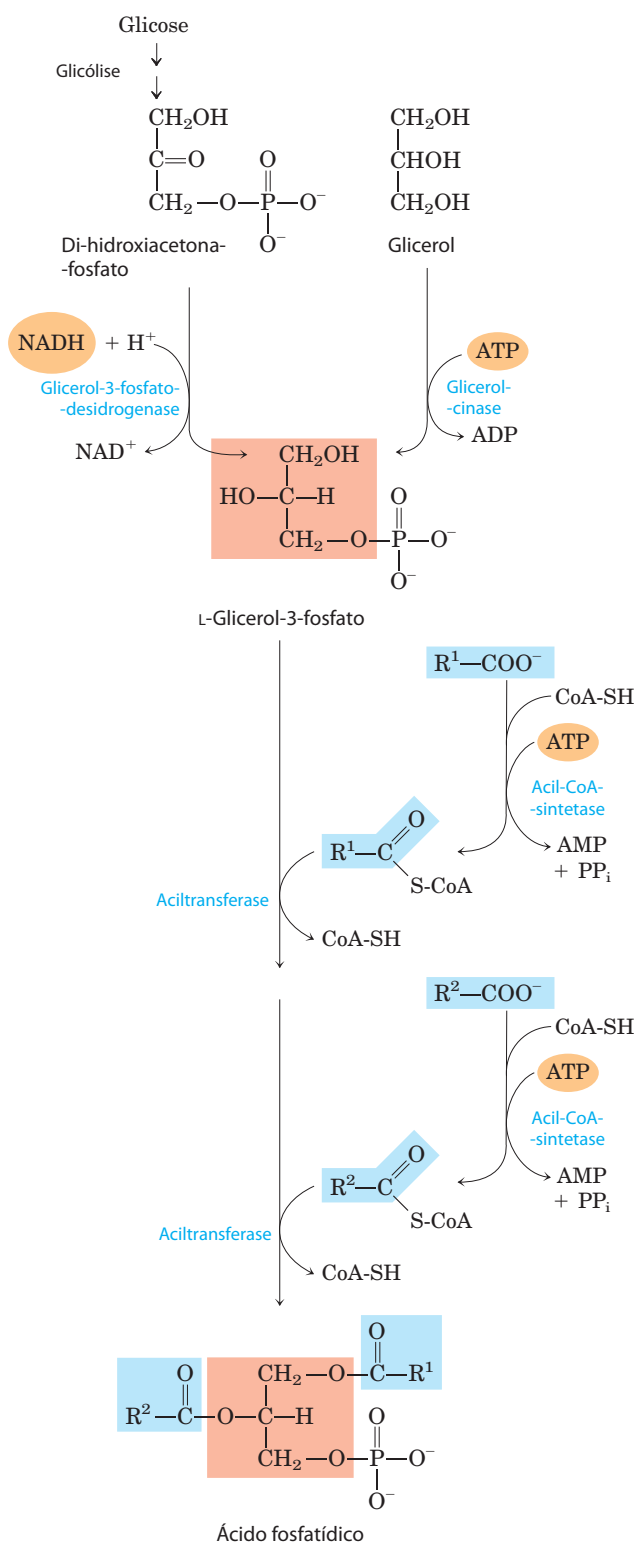



**FIGURA 21-17 Biossíntese do ácido fosfatídico.** Um grupo acil graxo é ativado pela formação de acil-CoA graxo, sendo então transferido para uma ligação éster com o L-glicerol-3-fosfato, formado em qualquer uma das duas vias mostradas. O ácido fosfatídico está mostrado aqui com a estereoquímica correta no C-2 da molécula do glicerol. (O produto intermediário com apenas um grupo acil-graxo esterificado é o ácido lisofosfatídico). Para economizar espaço nas figuras subsequentes (e na Figura 21-14), ambos os grupos acil graxos dos glicerofosfolipídeos e todos os três grupos acila dos triacilgliceróis são mostrados projetando-se para a direita.

**-sintetases**, as mesmas enzimas responsáveis pela ativação dos ácidos graxos na $\beta$-oxidação (ver Figura 17-5).

A primeira etapa na biossíntese dos triacilgliceróis é a acilação dos dois grupos hidroxila livres do L-glicerol-3--fosfato, por duas moléculas de acil-CoA graxo, gerando **diacilglicerol-3-fosfato**, mais comumente chamado de **ácido fosfatídico** ou fosfatidato (Figura 21-17). O ácido fosfatídico está presente apenas em quantidades muito pequenas na célula, mas é um intermediário central na biossíntese dos lipídeos; ele pode ser convertido tanto em um triacilglicerol quanto em um glicerofosfolipídeo. Na via de síntese de triacilgliceróis, o ácido fosfatídico é hidrolisado pela **ácido fosfatídico-fosfatase** (também chamado lipina), formando 1,2-diacilglicerol (**Figura 21-18**). Os diacilgliceróis são, então, convertidos em triacilgliceróis por transesterificação com um terceiro acil-CoA graxo.

## A biossíntese de triacilgliceróis nos animais é regulada por hormônios

Em humanos, a quantidade de gordura corpórea permanece relativamente constante por longos períodos, embora possam ocorrer pequenas variações em curto espaço de tempo, à medida que a ingestão calórica flutua. Os carboidratos, as gorduras ou as proteínas ingeridos em excesso à necessidade energética são armazenados na forma de triacilgliceróis, que podem ser mobilizados para o fornecimento de energia, capacitando o organismo a suportar períodos de jejum.

A biossíntese e a degradação dos triacilgliceróis são reguladas de modo que a via favorecida depende das fontes metabólicas e das necessidades a um dado momento. A velocidade da biossíntese dos triacilgliceróis é profundamente alterada pela ação de diversos hormônios. A insulina, por exemplo, promove a conversão de carboidrato em triacilgliceróis (**Figura 21-19**). Pessoas com diabetes melito grave, devido à falha na secreção ou na ação da insulina, além de não serem capazes de utilizar glicose de modo apropriado, falham também em sintetizar ácidos graxos a partir de carboidratos ou aminoácidos. Se o diabetes não é tratado, essas pessoas apresentam velocidade aumentada na oxidação de gorduras e na formação de corpos cetônicos (Capítulo 17) e, portanto, perdem peso. ■

Um fator adicional no balanço entre biossíntese e degradação de triacilgliceróis é que cerca de 75% de todos os ácidos graxos liberados pela lipólise são reesterificados, formando triacilgliceróis, em vez de serem utilizados como combustível. Essa relação persiste mesmo em condições de jejum, quando o metabolismo energético é desviado da utilização de carboidratos para a oxidação de ácidos graxos. Parte dessa reciclagem dos ácidos graxos acontece no tecido adiposo, com a reesterificação ocorrendo antes da liberação na corrente sanguínea; parte ocorre em um ciclo sistêmico, pelo qual os ácidos graxos

Ácido fosfatídico: $CH_2{-}O{-}C(=O){-}R^1$ / $CH{-}O{-}C(=O){-}R^2$ / $CH_2{-}O{-}P(=O)(O^-){-}O^-$

Ácido fosfatídico-fosfatase (lipina) → 1,2-Diacilglicerol: $CH_2{-}O{-}C(=O){-}R^1$ / $CH{-}O{-}C(=O){-}R^2$ / $CH_2OH$

Acil--transferase: $R^3{-}C(=O){-}S\text{-}CoA$ → CoA-SH

Triacilglicerol: $CH_2{-}O{-}C(=O){-}R^1$ / $CH{-}O{-}C(=O){-}R^2$ / $CH_2{-}O{-}C(=O){-}R^3$

Ligação do grupo polar (serina, colina, etanolamina, etc.) → Glicerofosfolipídeo: $CH_2{-}O{-}C(=O){-}R^1$ / $CH{-}O{-}C(=O){-}R^2$ / $CH_2{-}O{-}P(=O)(O^-){-}O{-}$Grupo polar

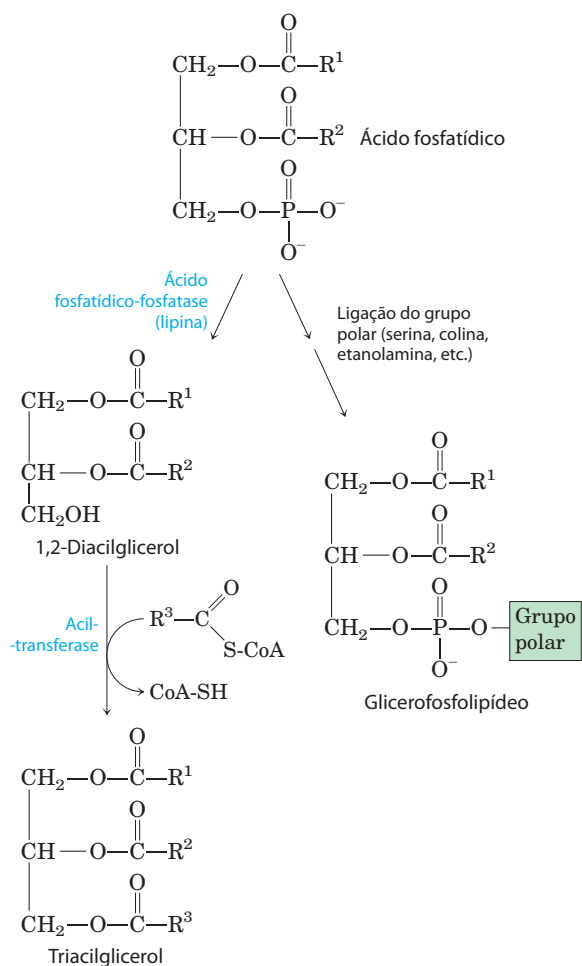



**FIGURA 21-18 O ácido fosfatídico na biossíntese de lipídeos.** O ácido fosfatídico é o precursor tanto dos triacilgliceróis quanto dos glicerofosfolipídeos. Os mecanismos para a ligação do grupo polar durante a síntese dos fosfolipídeos serão descritos posteriormente nesta seção.

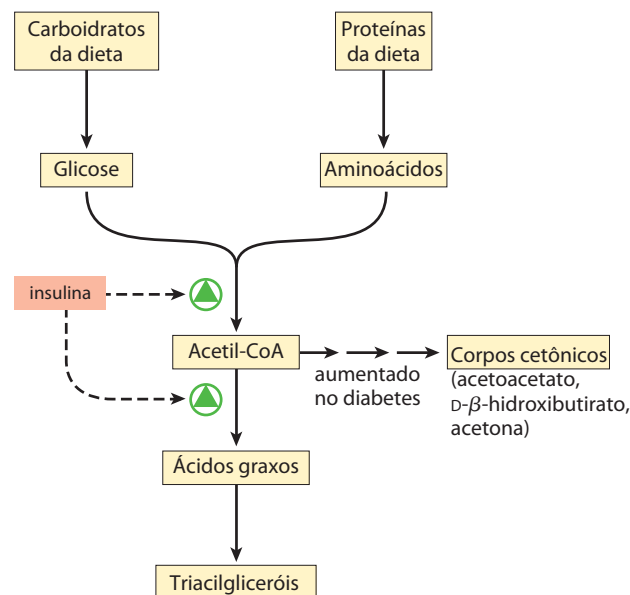



**FIGURA 21-19 Regulação da síntese de triacilgliceróis pela insulina.** A insulina estimula a conversão dos carboidratos e das proteínas da dieta em gordura. As pessoas com diabetes melito precisam de insulina ou são insensíveis a ela. Isso resulta em diminuição da síntese de ácidos graxos, e a acetil-CoA proveniente do catabolismo dos carboidratos e das proteínas é desviada para a produção de corpos cetônicos. Pessoas com cetose grave exalam cheiro de acetona, de modo que essa condição é, às vezes, confundida com embriaguez (p. 959).

livres são transportados ao fígado, reciclados em triacilgliceróis, exportados mais uma vez para o sangue (o transporte de lipídeos no sangue é discutido na Seção 21.4) e captados novamente pelo tecido adiposo após sua liberação a partir dos triacilgliceróis pela lipase lipoproteica extracelular (**Figura 21-20**; ver também Figura 17-1). O fluxo por esse **ciclo dos triacilgliceróis**, entre o tecido adiposo e o fígado, pode ser bastante lento quando outros combustíveis estão disponíveis e a liberação dos ácidos graxos do tecido adiposo é limitada, mas, como descrito anteriormente, a proporção de ácidos graxos liberados que são reesterificados permanece mais ou menos constante em cerca de 75% em todas as condições metabólicas. Assim, o nível de ácidos graxos livres no sangue reflete tanto a velocidade de liberação dos ácidos graxos quanto o balanço entre a síntese e a degradação dos triacilgliceróis no tecido adiposo e no fígado.

Quando a mobilização dos ácidos graxos é necessária para satisfazer as necessidades energéticas, sua liberação do tecido adiposo é estimulada pelos hormônios glucagon e adrenalina (ver Figuras 17-3 e 17-13). Simultaneamente, esses sinais hormonais diminuem a velocidade da glicólise e aumentam a velocidade da gliconeogênese no fígado (provendo glicose para o encéfalo, como descrito de forma mais elaborada no Capítulo 23). O ácido graxo liberado é captado por diversos tecidos, incluindo os músculos, onde ele é oxidado para a geração de energia. A maior parte do ácido graxo captado pelo fígado não é oxidada, mas é reciclada a triacilglicerol e retorna ao tecido adiposo.

A função do aparentemente ciclo fútil do triacilglicerol (ciclos fúteis são discutidos no Capítulo 15) não é bem compreendida. No entanto, emergem algumas possibilidades à medida que se aprende mais a respeito de como o ciclo do triacilglicerol é mantido pelo metabolismo em dois órgãos distintos e como ele é regulado de forma coordenada. Por exemplo, o excesso da capacidade do ciclo do triacilglicerol (o ácido graxo reconvertido a triacilglicerol e não oxidado como combustível) poderia representar uma reserva de energia na corrente sanguínea durante o jejum, a qual seria mais rapidamente mobilizada em uma emergência do tipo "luta ou fuga" do que a mobilização da energia armazenada na forma de triacilglicerol.

**FIGURA 21-20 O ciclo do triacilglicerol.** Em mamíferos, as moléculas de triacilglicerol são degradadas e ressintetizadas em um ciclo do triacilglicerol durante o jejum. Parte dos ácidos graxos liberados pela lipólise dos triacilgliceróis no tecido adiposo passa para a corrente sanguínea e o restante é utilizado para ressintetizar triacilglicerol. Parte dos ácidos graxos liberados no sangue é utilizada para fornecer energia (p. ex., no músculo), e parte é captada pelo fígado e utilizada para a síntese de triacilgliceróis. O triacilglicerol formado no fígado é transportado pelo sangue de volta ao tecido adiposo, onde os ácidos graxos são liberados pela lipase lipoproteica extracelular, captados pelos adipócitos e reesterificados em triacilgliceróis.

A reciclagem constante dos triacilgliceróis no tecido adiposo, mesmo durante o jejum, faz surgir uma segunda pergunta: qual é a fonte do glicerol-3-fosfato necessário para esse processo? Como descrito anteriormente, a glicólise é inibida nessas condições pela ação do glucagon e da adrenalina, de modo que pouco DHAP está disponível, e o glicerol liberado durante a lipólise não pode ser diretamente convertido em glicerol-3-fosfato no tecido adiposo, já que essas células não possuem a enzima glicerol-cinase (Figura 21-17). Assim, como é produzida uma quantidade suficiente de glicerol-3-fosfato? A resposta está em uma via descoberta há mais de três décadas, mas que recebeu pouca atenção até recentemente, uma via intimamente ligada ao ciclo do triacilglicerol e, em sentido mais amplo, ao balanço entre o metabolismo dos ácidos graxos e dos carboidratos.

## O tecido adiposo gera glicerol-3-fosfato por meio da gliceroneogênese

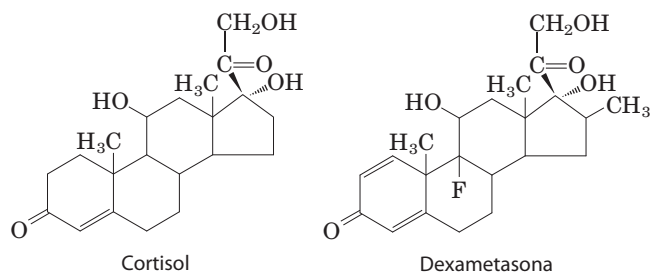
A **gliceroneogênese** é uma versão mais curta da gliconeogênese, partindo de piruvato a DHAP (ver Figura 14-17), seguindo-se a conversão de DHAP em glicerol-3-fosfato pela enzima citosólica glicerol-3-fosfato-desidrogenase ligada ao NAD (**Figura 21-21**). Depois, o glicerol-3-fosfato é utilizado na síntese de triacilglicerol. A gliceroneogênese foi descoberta na década de 1960 por Lea Reshef, Richard Hanson e John Ballard e, simultaneamente, por Eleazar Shafrir e colaboradores, que estavam intrigados com a presença de duas enzimas gliconeogênicas, a piruvato-carboxilase e a fosfoenolpiruvato (PEP) carboxicinase, no tecido adiposo, onde a glicose não é sintetizada. Após um longo período de desatenção, o interesse nessa via foi renovado pela demonstração de uma ligação entre a gliceroneogênese e o diabetes tipo 2, como será visto.

A gliceroneogênese desempenha múltiplas funções. No tecido adiposo, a gliceroneogênese, acoplada à reesterificação dos ácidos graxos livres, controla a velocidade de liberação dos ácidos graxos no sangue. No tecido adiposo marrom, a mesma via pode controlar a velocidade pela qual os ácidos graxos livres são enviados para a mitocôndria para utilização na termogênese (ver Figura 19-36). Nos seres humanos em jejum, a gliceroneogênese no fígado, sozinha, responde pela síntese de glicerol-3-fosfato suficiente para a reesterificação de até 65% dos ácidos graxos em triacilglicerol.

O fluxo pelo ciclo do triacilglicerol entre o fígado e o tecido adiposo é controlado em um grau elevado pela atividade da PEP-carboxicinase, a qual limita a velocidade de ambas, da gliconeogênese e da gliceroneogênese. Os

**FIGURA 21-21 Gliceroneogênese.** A via é, essencialmente, uma versão abreviada da gliconeogênese, partindo do piruvato até di-hidroxiacetona a fosfato (DHAP), seguindo-se a conversão de DHAP em glicerol-3-fosfato, utilizado para a síntese dos triacilgliceróis.

hormônios glicocorticoides, como o cortisol (esteroide biológico derivado do colesterol; ver Figura 21-48) e a dexametasona (glicocorticoide sintético), regulam os níveis de PEP-carboxicinase reciprocamente, no fígado e no tecido adiposo. Atuando nos receptores de glicocorticoides, esses hormônios esteroides aumentam a expressão do gene que codifica a PEP-carboxicinase no fígado, aumentando a gliconeogênese e a gliceroneogênese (**Figura 21-22**).

Cortisol          Dexametasona

A estimulação da gliceroneogênese leva a um aumento na síntese de moléculas de triacilglicerol no fígado e a sua liberação na corrente sanguínea. Ao mesmo tempo, no tecido adiposo, os glicocorticoides suprimem a expressão do gene que codifica a PEP-carboxicinase, o que resulta em um decréscimo na gliceroneogênese no tecido adiposo. Como resultado, ocorre a diminuição da reciclagem dos ácidos graxos, e mais ácidos graxos livres são liberados no sangue. Assim, a gliceroneogênese é regulada reciprocamente no fígado e no tecido adiposo, afetando o metabolismo dos

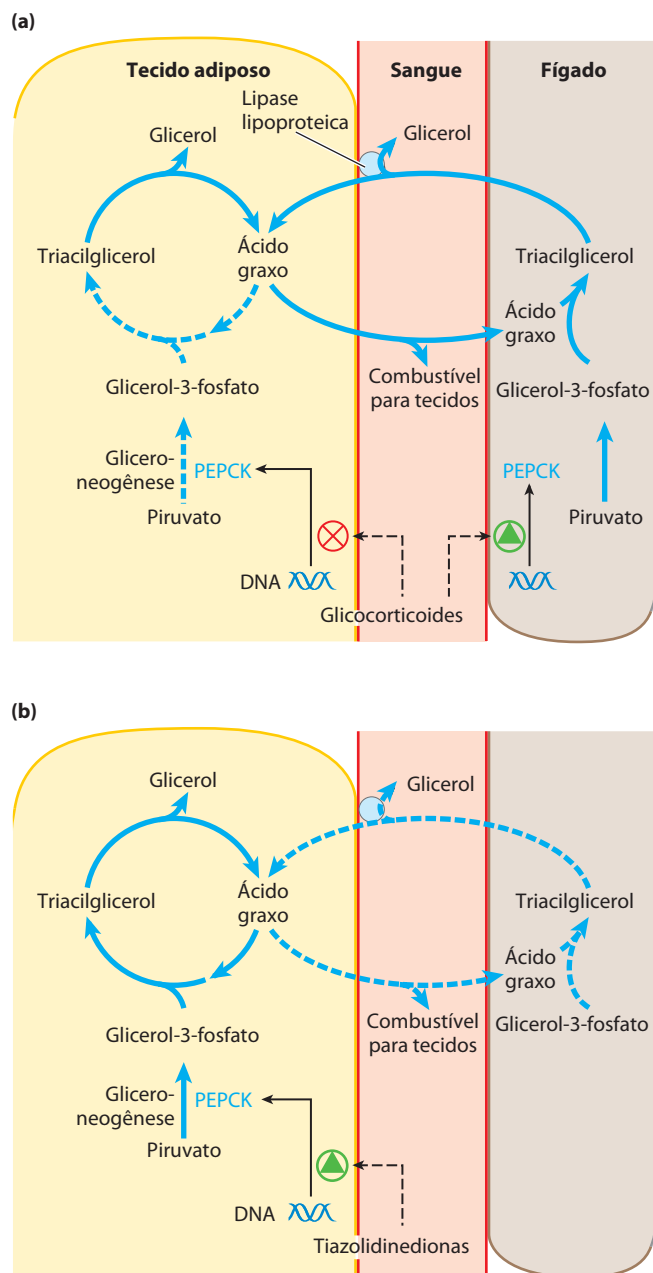



**FIGURA 21-22 Regulação da gliceroneogênese. (a)** Os hormônios glicocorticoides estimulam a gliceroneogênese e a gliconeogênese no fígado, enquanto suprimem a gliceroneogênese no tecido adiposo (pela regulação recíproca do gene que expressa a PEP-carboxicinase [PEPCK] nos dois tecidos), aumentando o fluxo pelo ciclo do triacilglicerol. O glicerol formado pela degradação dos triacilgliceróis no tecido adiposo é liberado no sangue e transportado para o fígado, onde é convertido, principalmente, em glicose, embora parte seja convertida em glicerol-3-fosfato pela glicerol-cinase. **(b)** Uma classe de fármacos chamados de tiazolidinedionas atualmente é utilizada no tratamento do diabetes tipo 2. Nessa doença, os altos níveis de ácidos graxos livres no sangue interferem com a utilização da glicose nos músculos e promovem resistência à insulina. As tiazolidinedionas ativam um receptor nuclear chamado de receptor ativado por proliferador do peroxissomo $\gamma$ (PPAR-$\gamma$), que induz a atividade da PEP-carboxicinase. Terapeuticamente, as tiazolidinedionas elevam a velocidade da gliceroneogênese, aumentando a síntese de triacilglicerol no tecido adiposo e reduzindo a quantidade de ácido graxo livre na corrente sanguínea.

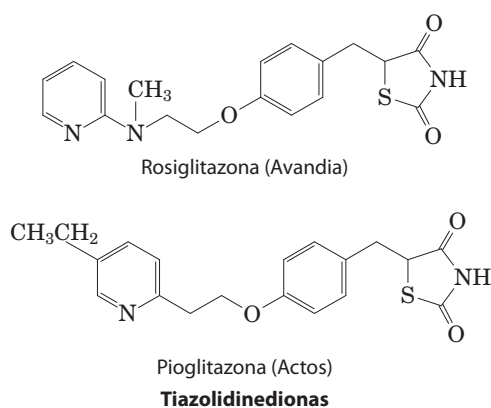
lipídeos de formas opostas: uma menor velocidade da gliceroneogênese no tecido adiposo leva a uma maior liberação de ácidos graxos (e não reciclagem), enquanto uma alta velocidade no fígado leva a uma maior síntese e exportação dos triacilgliceróis. O resultado líquido é um aumento no fluxo por meio do ciclo dos triacilgliceróis. Quando os glicocorticoides não estão mais presentes, o fluxo pelo ciclo diminui, já que a expressão da PEP-carboxicinase aumenta no tecido adiposo e diminui no fígado.

### As tiazolidinedionas tratam o diabetes tipo 2 aumentando a gliceroneogênese

A recente atenção dada à gliceroneogênese surgiu, em parte, da ligação entre esta via e o diabetes. Os altos níveis de ácidos graxos livres no sangue interferem com a utilização da glicose nos músculos e promovem a resistência à insulina, que leva ao diabetes tipo 2. Uma nova classe de fármacos, chamada de **tiazolidinedionas**, reduz os níveis dos ácidos graxos circulantes no sangue e aumenta a sensibilidade à insulina. As tiazolidinedionas promovem a indução da PEP-carboxicinase no tecido adiposo (Figura 21-22), levando ao aumento na síntese dos precursores da gliceroneogênese. Portanto, o efeito terapêutico das tiazolidinedionas é devido, pelo menos em parte, ao aumento na gliceroneogênese, que, por sua vez, aumenta a síntese de triacilgliceróis no tecido adiposo e reduz a liberação de ácidos graxos livres do tecido adiposo para a corrente sanguínea. Os benefícios de um desses fármacos, a rosiglitazona (Avandia), são contrapostos, em parte, pelo aumento do risco de ataque cardíaco, por motivos ainda não esclarecidos. A avaliação desse fármaco continua e ele está disponível apenas por um sistema de distribuição restrito.

Rosiglitazona (Avandia)

Pioglitazona (Actos)

**Tiazolidinedionas** ■

### RESUMO 21.2 Biossíntese de triacilgliceróis

- Os triacilgliceróis são formados pela reação de duas moléculas de acil-CoA graxo com glicerol-3-fosfato, formando ácido fosfatídico; esse produto é desfosforilado a um diacilglicerol e, então, acilado por uma terceira molécula de acil-CoA graxo para gerar um triacilglicerol.
- A síntese e a degradação dos triacilgliceróis são reguladas por hormônios.
- A mobilização e a reciclagem das moléculas de triacilglicerol resultam em um ciclo do triacilglicerol. Os triacilgliceróis são sintetizados novamente a partir de ácidos graxos livres e glicerol-3-fosfato, mesmo durante o jejum. A di-hidroxiacetona-fosfato, precursora do glicerol-3-fosfato, é derivada do piruvato via gliceroneogênese.

## 21.3 Biossíntese de fosfolipídeos de membrana

No Capítulo 10, foram apresentadas as duas principais classes de fosfolipídeos de membrana: glicerofosfolipídeos e esfingolipídeos. Muitas espécies diferentes de fosfolipídeos podem ser construídas pela combinação de diversos ácidos graxos e grupos que funcionam como cabeças polares utilizando o esqueleto de glicerol ou de esfingosina (ver Figuras 10-9 e 10-13). Todas as vias biossintéticas seguem alguns padrões básicos. Em geral, a formação dos fosfolipídeos a partir de precursores simples requer (1) síntese da molécula-esqueleto (glicerol ou esfingosina); (2) acoplamento do(s) ácido(s) graxo(s) ao esqueleto por meio de uma ligação éster ou amida; (3) adição de um grupo hidrofílico ao esqueleto por uma ligação fosfodiéster; e, em alguns casos, (4) alteração ou troca do grupo polar, gerando o produto final fosfolipídico.

Em células eucarióticas, a síntese dos fosfolipídeos ocorre principalmente sobre a superfície do RE liso e da membrana interna da mitocôndria. Alguns fosfolipídeos recém-formados permanecem no local de síntese, mas a maior parte é destinada para outras localizações celulares. O processo pelo qual os fosfolipídeos insolúveis em água movem-se do local de síntese para o ponto onde irão desempenhar suas funções não está totalmente conhecido, mas serão discutidos alguns mecanismos que emergiram em estudos recentes.

### As células dispõem de duas estratégias para o acoplamento dos grupos polares dos fosfolipídeos

As primeiras etapas na síntese dos glicerofosfolipídeos são compartilhadas com a via de síntese dos triacilgliceróis (Figura 21-17): dois grupos acil graxo são esterificados no C-1 e no C-2 do L-glicerol-3-fosfato, formando ácido fosfatídico. Comumente, mas não invariavelmente, o ácido graxo em C-1 é saturado e aquele em C-2 é insaturado. Uma segunda via de síntese do ácido fosfatídico é a fosforilação de um diacilglicerol por uma cinase específica.

O grupo polar dos glicerofosfolipídeos é unido por meio de uma ligação fosfodiéster, em que cada uma das duas hidroxilas alcoólicas (uma no grupo polar e a outra no C-3 do glicerol) forma um éster com o ácido fosfórico (**Figura 21-23**). No processo biossintético, uma das hidroxilas é, primeiramente, ativada pela ligação a um nucleotídeo, a citidina-difosfato (CDP). A citidina-monofosfato (CMP) é, então, deslocada por um ataque nucleofílico da outra hidroxila (**Figura 21-24**). A CDP é acoplada ao diacilglicerol, formando o ácido fosfatídico ativado **CDP-diacilglicerol** (estratégia 1) ou ao hidroxil do grupo polar (estratégia 2). As células eucarióticas utilizam ambas as estratégias,

Diacilglicerol

Álcool

Ácido fosfórico

Álcool

Grupo polar

Fosfodiéster

Glicerofosfolipídeo

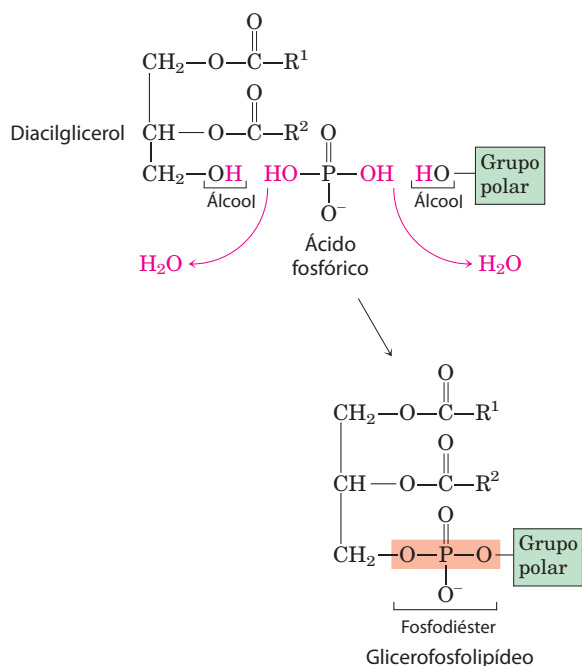



**FIGURA 21-23 Ligação do grupo polar.** O grupo polar do fosfolipídeo é acoplado ao diacilglicerol por meio de uma ligação fosfodiéster, formada quando o ácido fosfórico é condensado com dois alcoóis, eliminando duas moléculas de $H_2O$.

enquanto as bactérias utilizam apenas a primeira. A importância central dos nucleotídeos de citidina na biossíntese dos lipídeos foi descoberta por Eugene P. Kennedy no início da década de 1960, e essa via é comumente chamada de a Via Kennedy.

## A síntese dos fosfolipídeos em *E. coli* utiliza CDP-diacilglicerol

A primeira estratégia para o acoplamento do grupo polar é ilustrado pela síntese de fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilglicerol em *E. coli*. O diacilglicerol é ativado por condensação do ácido fosfatídico com citidina-trifosfato (CTP), formando CDP-diacilglicerol, com a eliminação de pirofosfato (**Figura 21-25**). O deslocamento de CMP por meio do ataque nucleofílico efetuado pelo grupo hidroxila da serina ou pela hidroxila em C-1 do glicerol-3-fosfato gera **fosfatidilserina** ou fosfatidilglicerol-3-fosfato, respectivamente. O último sofre um processamento adicional pela clivagem do fosfato monoéster (com a liberação de $P_i$), gerando **fosfatidilglicerol**.

Fosfatidilserina e fosfatidilglicerol podem funcionar como precursores de outros lipídeos de membrana em bactérias (Figura 21-25). A descarboxilação da porção serina da fosfatidilserina, catalisada pela fosfatidilserina-descarboxilase, gera **fosfatidiletanolamina**. Em *E. coli*, a condensação de duas moléculas de fosfatidilglicerol, com a eliminação de

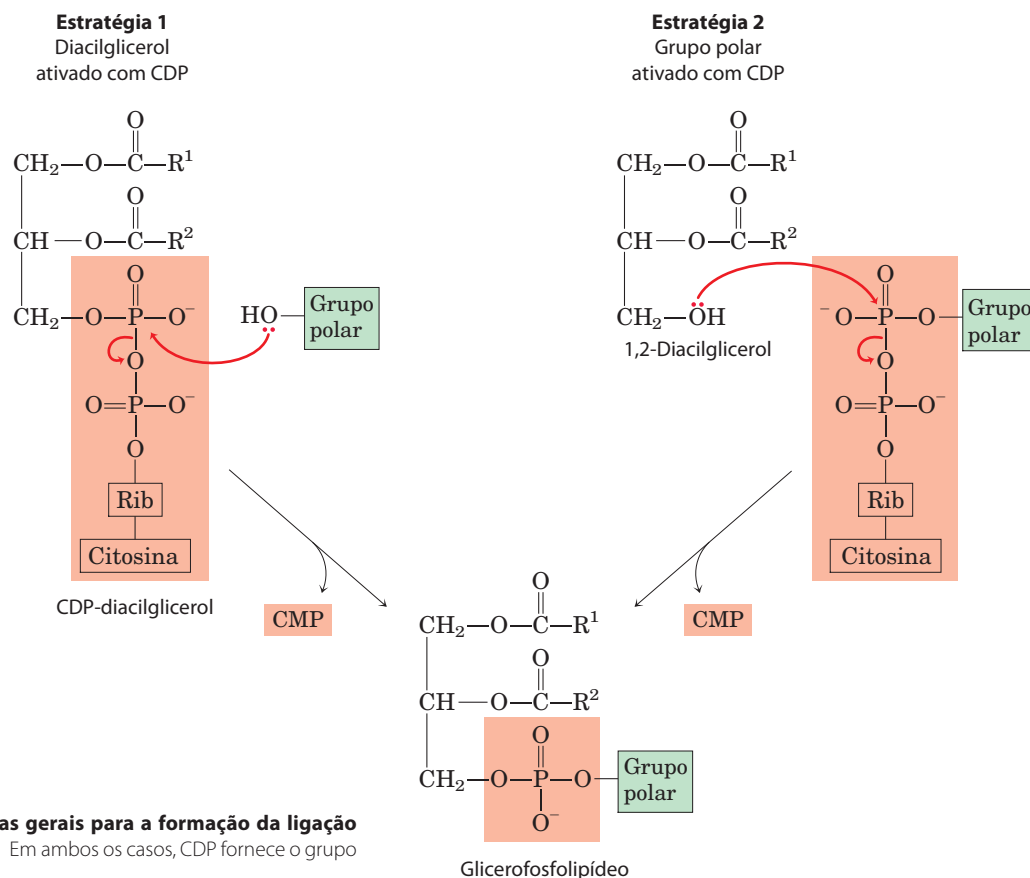



**FIGURA 21-24 Duas estratégias gerais para a formação da ligação fosfodiéster dos fosfolipídeos.** Em ambos os casos, CDP fornece o grupo fosfato da ligação fosfodiéster.

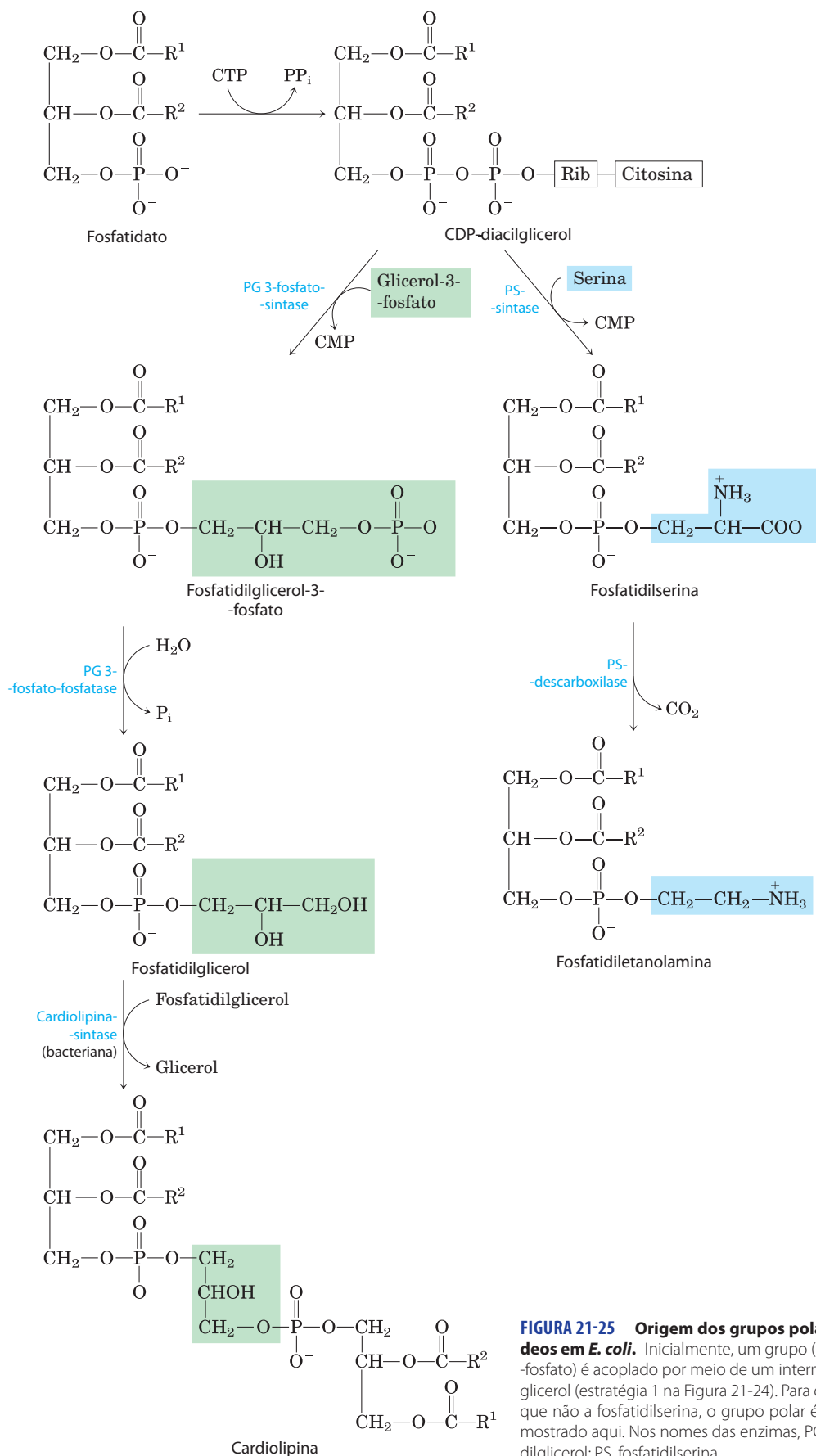



**FIGURA 21-25 Origem dos grupos polares dos fosfolipídeos em *E. coli*.** Inicialmente, um grupo (serina ou glicerol-3--fosfato) é acoplado por meio de um intermediário CDP-diacilglicerol (estratégia 1 na Figura 21-24). Para outros fosfolipídeos, que não a fosfatidilserina, o grupo polar é modificado, como mostrado aqui. Nos nomes das enzimas, PG representa fosfatidilglicerol; PS, fosfatidilserina.

**FIGURA 21-26 Síntese de cardiolipina e fosfatidilinositol em eucariotos.** Estes glicerofosfolipídeos são sintetizados usando a estratégia 1 da Figura 21-24. O fosfatidilglicerol é sintetizado como nas bactérias (ver Figura 21-25). PI representa fosfatidilinositol.

CDP-diacilglicerol

Fosfatidilglicerol → CMP (Cardiolipina-sintase (eucariótica))

Inositol → CMP (PI-sintase)

Cardiolipina

Fosfatidilinositol

Esses grupos —OH também podem ser esterificados com $—PO_3^{2-}$.

um glicerol, forma a **cardiolipina**, em que dois diacilgliceróis são ligados por meio de uma cabeça polar em comum.

## Os eucariotos sintetizam fosfolipídeos aniônicos a partir de CDP-diacilglicerol

Nos eucariotos, fosfatidilglicerol, cardiolipina e fosfatidilinositol (todos fosfolipídeos aniônicos; ver Figura 10-9) são sintetizados pela mesma estratégia utilizada para a síntese dos fosfolipídeos em bactérias. O fosfatidilglicerol é formado exatamente como nas bactérias. A síntese da cardiolipina em eucariotos é um pouco diferente: o fosfatidilglicerol condensa-se com CDP-diacilglicerol (**Figura 21-26**), e não com outra molécula de fosfatidilglicerol, como em *E. coli* (Figura 21-25).

O fosfatidilinositol é sintetizado pela condensação de CDP-diacilglicerol com inositol (Figura 21-26). **Fosfatidilinositol-cinases** específicas convertem então o fosfatidilinositol em seus derivados fosforilados. O fosfatidilinositol e seus produtos fosforilados localizados na membrana plasmática exercem função central na transdução de sinal em eucariotos (ver Figuras 12-10 e 12-16).

## As vias eucarióticas para síntese de fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina são inter-relacionadas

As leveduras, assim como as bactérias, são capazes de produzir fosfatidilserina pela condensação de CDP-diacilglicerol e serina e podem sintetizar fosfatidiletanolamina a partir de fosfatidilserina em uma reação catalisada pela fosfatidilserina-descarboxilase (**Figura 21-27**). A fosfatidiletanolamina pode ser convertida em **fosfatidilcolina** (lecitina) pela adição de três grupos metila ao seu grupo amino; *S*-adenosilmetionina é o grupo doador de metila (ver Figura 18-18) para todas as três reações de metilação. As vias de síntese de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina em leveduras estão resumidas na **Figura 21-28**. Essas vias são as principais fontes de fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina em todas as células eucarióticas.

Nos mamíferos, a fosfatidilserina não é sintetizada a partir de CDP-diacilglicerol; em vez disso, ela é derivada da fosfatidiletanolamina ou da fosfatidilcolina por meio da reação de troca do grupo polar; tal troca pode ocorrer por um de dois processos, que ocorrem no RE (**Figura 21-29a**). A

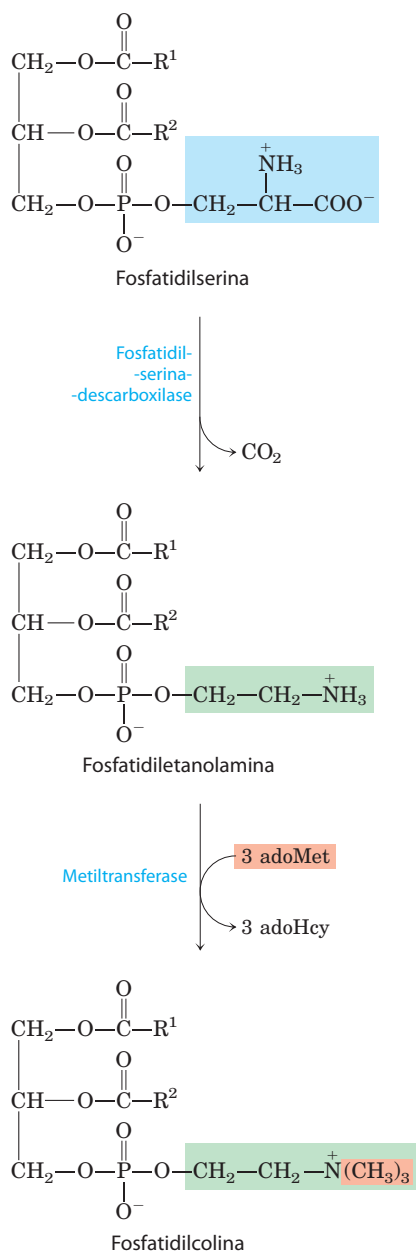



**FIGURA 21-27 A principal via partindo de fosfatidilserina até fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina em todos os eucariotos.** AdoMet representa *S*-adenosilmetionina; adoHcy, *S*-adenosilomocisteína.

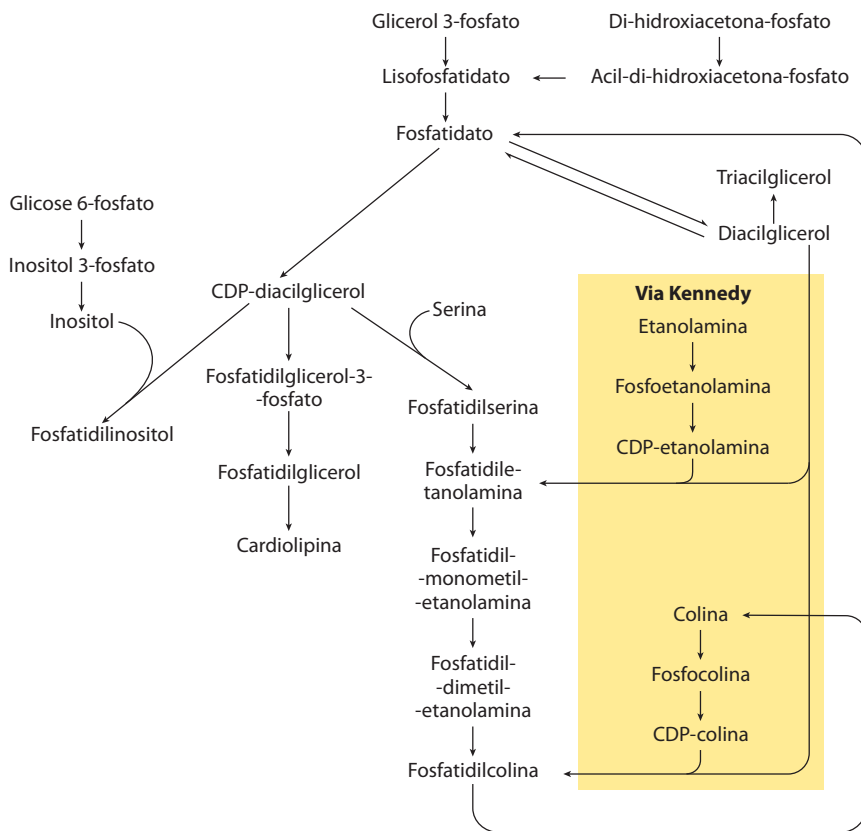



**FIGURA 21-28 Resumo das vias de síntese dos principais fosfolipídeos e triacilglicerídeos em eucarióticos (leveduras).** O ácido fosfatídico é formado por transacetilação do L-glicerol-3-fosfato com dois grupos acil-graxo doados por acil-CoA graxo. A enzima ácido fosfatídico-fosfatase (lipina) converte o ácido fosfatídico em diacilglicerol, que na via Kennedy condensa-se com o grupo cabeça ativado por CDP (etanolamina ou colina) para formar fosfatidiletanolamina ou fosfatidilcolina. Alternativamente, o ácido fosfatídico pode ser ativado com a porção CDP, que é deslocada pela condensação com o grupo cabeça – inositol, glicerol-3-fosfato ou serina, formando fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol ou fosfatidilserina. A descarboxilação de fosfatidilserina gera fosfatidiletanolamina e a metilação de fosfatidiletanolamina produz fosfatidilcolina. Não estão mostradas aqui as reações de troca de grupo cabeça (ver Figura 21-29a) que interconverte fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilcolina em mamíferos. O ácido lisofosfatídico é o ácido fosfatídico faltando um dos dois grupos acil-graxo.

síntese de fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina nos mamíferos ocorre pela estratégia 2 da Figura 21-24: fosforilação e ativação do grupo polar, seguidos pela condensação com diacilglicerol. Por exemplo, a colina é reutilizada ("via de salvação") por fosforilação, seguida de conversão em CDP-colina pela condensação com CTP. Um diacilglicerol desloca CMP da CDP-colina, produzindo fosfatidilcolina (Figura 21-29b). Uma via de salvação análoga converte a etanolamina obtida na dieta em fosfatidiletanolamina. No fígado, fosfatidilcolina também é produzida pela metilação de fosfatidiletanolamina (com *S*-adenosilmetionina, como descrito anteriormente), mas em todos os outros tecidos a fosfatidilcolina é produzida apenas por condensação de diacilglicerol e CDP-colina.

## A síntese de plasmalogênio requer a formação de um álcool graxo unido por ligação éter

A via biossintética dos éter-lipídeos, incluindo os **plasmalogênios** e o **fator ativador de plaquetas** (ver Figura 10-10), envolve o deslocamento de um grupo acil graxo esterificado por um álcool de cadeia longa para formar a ligação éter (**Figura 21-30**). Segue-se a ligação do grupo polar do lipídeo, por mecanismos essencialmente iguais àqueles utilizados na síntese dos fosfolipídeos comuns, formados por ligação éster. Finalmente, a ligação dupla característica dos plasmalogênios (sombreada em azul na Figura 21-30) é introduzida pela ação de uma oxidase de função mista semelhante àquela responsável pela dessaturação dos ácidos

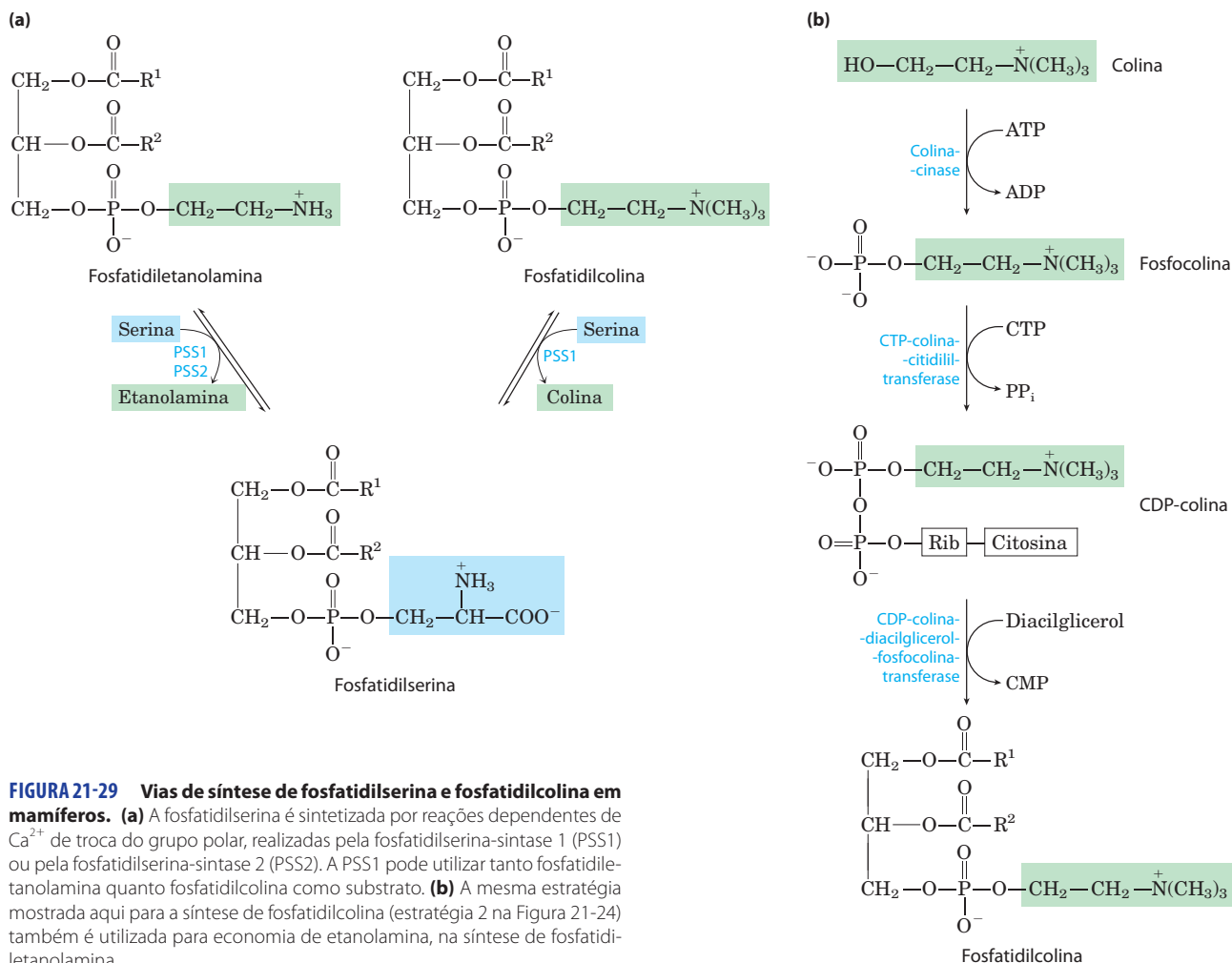



**FIGURA 21-29 Vias de síntese de fosfatidilserina e fosfatidilcolina em mamíferos. (a)** A fosfatidilserina é sintetizada por reações dependentes de $Ca^{2+}$ de troca do grupo polar, realizadas pela fosfatidilserina-sintase 1 (PSS1) ou pela fosfatidilserina-sintase 2 (PSS2). A PSS1 pode utilizar tanto fosfatidiletanolamina quanto fosfatidilcolina como substrato. **(b)** A mesma estratégia mostrada aqui para a síntese de fosfatidilcolina (estratégia 2 na Figura 21-24) também é utilizada para economia de etanolamina, na síntese de fosfatidiletanolamina.

graxos (Figura 21-13). O peroxissomo é o principal local de síntese dos plasmalogênios.

## As vias de síntese de esfingolipídeos e glicerofosfolipídeos compartilham precursores e alguns mecanismos

A biossíntese dos esfingolipídeos ocorre em quatro estágios: (1) síntese da amina de 18 carbonos, **esfinganina**, a partir de palmitoil-CoA e serina; (2) acoplamento de um ácido graxo por uma ligação amida, gerando ***N*-acilesfinganina**; (3) dessaturação da porção esfinganina formando ***N*-acilesfingosina** (ceramida); e (4) acoplamento de um grupo polar para a produção de esfingolipídeos, como **cerebrosídio** ou **esfingomielina** (**Figura 21-31**). As primeiras etapas dessa via ocorrem no RE, enquanto o acoplamento dos grupos que funcionarão como cabeças polares no estágio 4 ocorre no aparelho de Golgi. A via compartilha diversas características com as vias de síntese dos glicerofosfolipídeos: NADPH fornece o poder redutor, e os ácidos graxos entram na via como seus derivados CoA ativados. Na formação dos cerebrosídeos, açúcares entram na via como seus derivados nucleotídicos ativados. O acoplamento dos grupos polares na síntese dos esfingolipídeos apresenta diversos aspectos novos. A fosfatidilcolina, em vez de CDP-colina, atua como doadora de fosfocolina na síntese de esfingomielina.

Nos glicolipídeos – os cerebrosídeos e os **gangliosídeos** (ver Figura 10-13) –, o açúcar que funciona como a cabeça polar é acoplado diretamente à hidroxil em C-1 da esfingosina por meio de uma ligação glicosídica, e não por uma ligação fosfodiéster. O doador do açúcar é um UDP-açúcar (UDP-glicose ou UDP-galactose).

## Os lipídeos polares são direcionados para membranas celulares específicas

Após a síntese no RE liso, os lipídeos polares, incluindo glicerofosfolipídeos, esfingolipídeos e glicolipídeos, são inseridos em membranas celulares específicas em proporções específicas, por mecanismos ainda não conhecidos. Os lipídeos de membrana são insolúveis em água, de modo que não podem simplesmente difundir do seu local de síntese (o RE) para o seu local de inserção. Em vez disso, eles são transportados do RE para o aparelho de Golgi, onde pode ocorrer síntese adicional. Eles são, então, transportados em

Acil-CoA graxo + Di-hidroxiacetona-fosfato → (CoA-SH) → 1-Acil-di-hidroxiacetona-3-fosfato

grupo acila graxo

$R^1$—$COO^-$

1-alquil-di-hidroxi-acetona-3-fosfato-sintase

$R^2$—$CH_2$—$CH_2$—OH
Álcool graxo saturado

$R^2$—$CH_2$—C(O)S-CoA + 2 NADPH + $2H^+$ → $2NADP^+$ + CoA-SH

álcool de cadeia longa

1-Alquil-di-hidroxiacetona-3-fosfato

1-alquil-di-hidroxi-acetona-3-fosfato-redutase (NADPH + $H^+$ → $NADP^+$)

1-Alquilglicerol-3-fosfato

1-alquilglicerol-3-fosfato-aciltransferase ($R^3$—C(O)S-CoA → CoA-SH)

1-Alquil-2-acilglicerol-3-fosfato

Ligação do grupo polar (Etanolamina)

Oxidase de função mista (NADH + $H^+$, $O_2$ → $2H_2O$, $NAD^+$)

Plasmalogênio

**FIGURA 21-30 A síntese de lipídeos com ligação éter ou de plasmalogênios.** A ligação éter recém-formada está sombreada em vermelho-claro. O intermediário 1-alquil-2-acilglicerol-3-fosfato é o éter análogo do ácido fosfatídico. Os mecanismos para a ligação da cabeça polar aos éter-lipídeos são essencialmente os mesmos daqueles utilizados para seus análogos unidos por ligação éster. A ligação dupla característica dos plasmalogênios (sombreada em azul) é introduzida na etapa final por um sistema de oxidase de função mista semelhante àquele mostrado na Figura 21-13.

vesículas membranosas que brotam do aparelho de Golgi, movem-se e fundem-se com a membrana-alvo. As proteínas de transferência de esfingolipídeos carregam ceramida do RE para o aparelho de Golgi, onde ocorre a síntese de esfingomielina. Proteínas citosólicas também ligam fosfolipídeos e esteróis e os transportam entre as membranas celulares. Esses mecanismos contribuem para o estabelecimento da composição lipídica característica da membrana das organelas (ver Figura 11-2).

## RESUMO 21.3 Biossíntese de fosfolipídeos de membrana

- Os diacilgliceróis são os principais precursores dos glicerofosfolipídeos.
- Nas bactérias, a fosfatidilserina é formada pela condensação da serina com CDP-diacilglicerol; a descarboxilação da fosfatidilserina produz fosfatidiletanolamina. O fosfatidilglicerol é formado pela condensação de CDP-diacilglicerol com glicerol-3-fosfato, seguida pela remoção do fosfato em ligação monoéster.
- As vias nas leveduras para a síntese de fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilglicerol são semelhantes àquelas que ocorrem nas bactérias; a fosfatidilcolina é formada pela metilação de fosfatidiletanolamina.
- As células de mamíferos dispõem de algumas vias semelhantes àquelas em bactérias, mas de vias um pouco diferentes para sintetizar fosfatidilcolina e fosfatidileta-

nolamina. O álcool que funciona como grupo polar (colina ou etanolamina) é ativado como um derivado CDP e, então, condensado com diacilglicerol. A fosfatidilserina é derivada apenas da fosfatidiletanolamina.

- A síntese de plasmalogênios envolve a formação de sua ligação dupla característica por uma oxidase de função mista. Os grupos polares dos esfingolipídeos são acoplados por mecanismos singulares.
- Os fosfolipídeos chegam a seus destinos intracelulares por meio de vesículas de transporte ou proteínas específicas.

## 21.4 Colesterol, esteroides e isoprenoides: biossíntese, regulação e transporte

O colesterol é sem dúvida o lipídeo que recebe maior publicidade, sendo famoso devido à forte correlação entre altos níveis de colesterol no sangue e incidência de doenças cardiovasculares em humanos. Muito menos divulgado é o papel crucial do colesterol como um componente das membranas celulares e como um precursor dos hormônios esteroides e dos ácidos biliares. O colesterol é uma molécula essencial em muitos animais, incluindo os seres humanos, mas não é necessário que esteja presente na dieta de mamíferos – todas as células são capazes de sintetizá-lo a partir de precursores simples.

A estrutura desse composto de 27 carbonos sugere uma via biossintética complexa, porém todos os seus átomos de carbono são fornecidos por um único precursor – o acetato. As unidades de **isopreno**, os intermediários essenciais na via partindo do acetato até o colesterol, também são precursores de muitos outros lipídeos naturais, e os mecanismos pelos quais as unidades de isopreno são polimerizadas são semelhantes em todas essas vias.

$$CH_2{=}C(CH_3){-}CH{=}CH_2$$

Isopreno

Inicialmente será realizada uma descrição das principais etapas na biossíntese do colesterol a partir de acetato, e, então, será discutido o transporte do colesterol no sangue, sua captação pelas células, a regulação da síntese do colesterol em pessoas normais e sua regulação naquelas com defeitos na captação do colesterol ou em seu transporte. A seguir, serão considerados outros componentes celulares derivados do colesterol, como os ácidos biliares e os hormônios esteroides. Finalmente, será apresentado um esboço

Palmitoil-CoA → (Serina; CoA-SH, $CO_2$) → β-Cetoesfinganina → (NADPH + $H^+$; $NADP^+$) → Esfinganina → (Acil-CoA graxo; CoA-SH) → *N*-Acilesfinganina → (Oxidase de função mista (animais)) → Ceramida contendo esfingosina

Ceramida contendo esfingosina → (UDP-Glc; UDP) → Cerebrosídeo

Ceramida contendo esfingosina → Ligação do grupo polar (Fosfatidilcolina; Diacilglicerol) → Esfingomielina

**FIGURA 21-31 Biossíntese de esfingolipídeos.** A condensação da palmitoil-CoA com a serina (formando β-cetoesfinganina), seguida da redução por NADPH, forma esfinganina, que é então acilada a *N*-acilesfinganina (uma ceramida). Nos animais, uma ligação dupla (sombreada em vermelho-claro) é formada por uma oxidase de função mista antes da adição final do grupo polar: fosfatidilcolina, formando esfingomielina, ou glicose, formando um cerebrosídeo.

das vias biossintéticas de alguns dos muitos compostos derivados das unidades de isopreno, que compartilham etapas iniciais com a via de síntese do colesterol, ilustrando a extraordinária versatilidade das condensações de isoprenoides na biossíntese.

## O colesterol é formado a partir da acetil-CoA em quatro etapas

O colesterol, assim como os ácidos graxos de cadeia longa, é formado a partir de acetil-CoA. Mas o esquema de montagem do colesterol é muito diferente daquele dos ácidos graxos de cadeia longa. Nos primeiros experimentos para o estudo dessa via, os animais eram alimentados com acetato marcado com $^{14}$C, tanto no carbono do grupo metil quanto no carbono da carboxil. O padrão de marcação no colesterol isolado dos dois grupos de animais (**Figura 21-32**) forneceu as informações para se desvendar as etapas enzimáticas na biossíntese do colesterol.

A síntese ocorre em quatro estágios, como representado na **Figura 21-33**: ❶ condensação de três unidades de acetato, formando um intermediário de seis carbonos, o mevalonato; ❷ conversão do mevalonato em unidades de isopreno ativadas; ❸ polimerização das seis unidades de isopreno com 5 carbonos, formando o esqualeno linear, com 30 carbonos; e ❹ ciclização do esqualeno para formar os quatro anéis do núcleo esteroide, com uma série de mudanças adicionais (oxidações, remoção ou migração de grupos metil) para produzir o colesterol.

**Estágio ❶ Síntese do mevalonato a partir de acetato.** O primeiro estágio na biossíntese do colesterol leva ao intermediário **mevalonato** (**Figura 21-34**). Duas moléculas de acetil-CoA condensam-se para formar acetoacetil-CoA, que se condensa com uma terceira molécula de acetil-CoA, gerando o composto de seis carbonos **β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA** (**HMG-CoA**). As duas primeiras reações são catalisadas pela **acetil-CoA-acetil transferase** e pela **HMG-CoA-sintase**, respectivamente. A HMG-CoA-sintase citosólica dessa via é distinta da isoenzima mitocondrial, que catalisa a síntese de HMG-CoA na formação de corpos cetônicos (ver Figura 17-19).

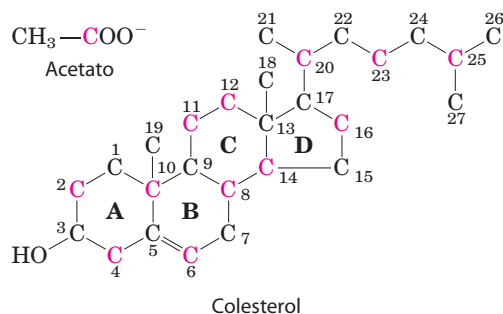
$CH_3—COO^-$ Acetato

Colesterol

**FIGURA 21-32 Origem dos átomos de carbono do colesterol.** A origem pode ser deduzida a partir de experimentos usando acetato marcado no carbono da metil (em preto) ou no carbono da carboxil (em cor-de-rosa). Os anéis individuais do sistema de anéis fundidos são denominados de A a D.

$3\ CH_3—COO^-$ Acetato

❶

$^-OOC—CH_2—C(CH_3)(OH)—CH_2—CH_2—OH$ Mevalonato

❷

$CH_2{=}C(CH_3)—CH_2—CH_2—O—P(O)(O^-)—O—P(O)(O^-)—O^-$

isopreno

Isopreno ativado

❸

Esqualeno

❹

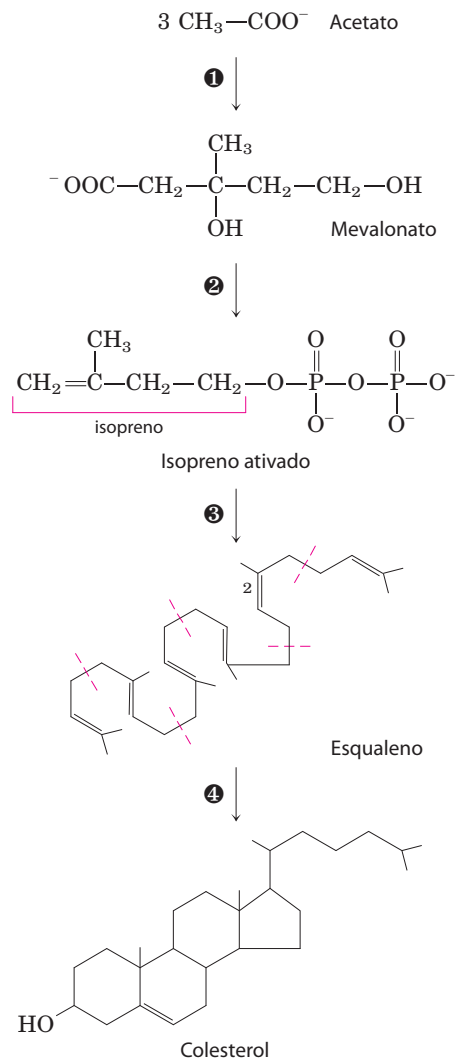
HO

Colesterol

**FIGURA 21-33 Resumo da biossíntese de colesterol.** Os quatro estágios são discutidos no texto. As unidades isoprenoides no esqualeno estão demarcadas pelas linhas tracejadas em cor-de-rosa.

A terceira reação é o passo comprometido com a via: a redução de HMG-CoA em mevalonato, para o qual cada uma de duas moléculas de NADPH doa dois elétrons. A **HMG-CoA-redutase**, proteína integral de membrana do RE liso, é o principal ponto de regulação da via do colesterol, como será visto.

**Estágio ❷ Conversão de mevalonato em dois isoprenos ativados.** No próximo estágio da síntese de colesterol, três grupos fosfato são transferidos de três moléculas de ATP para o mevalonato (**Figura 21-35**). O fosfato ligado ao grupo hidroxil em C-3 do mevalonato no intermediário 3-fosfo-5-pirofosfomevalonato é um bom grupo de saída; na próxima etapa, tanto este fosfato quanto o grupo carboxila vizinho saem, produzindo uma ligação dupla no produto de cinco carbonos, o **$\Delta^3$-isopentenil-pirofosfato**. Esse é o primeiro dos dois isoprenos ativados centrais para a formação do colesterol. A isomerização do $\Delta^3$-isopentenil-pirofosfato gera o segundo isopreno ativado, o **dimetilalil-pirofosfato**. A

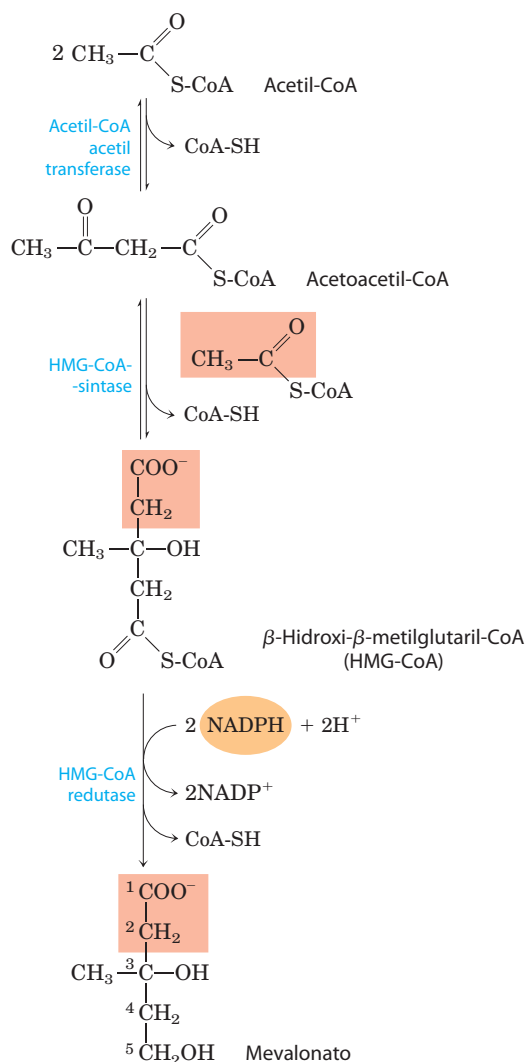



**FIGURA 21-34 Formação do mevalonato a partir de acetil-CoA.** A origem dos carbonos C-1 e C-2 do mevalonato a partir de acetil-CoA está mostrada em cor salmão.

síntese do isopentenil-pirofosfato no citoplasma de células vegetais segue a via descrita anteriormente. Entretanto, os cloroplastos das plantas e muitas bactérias utilizam uma via independente de mevalonato. Essa via alternativa não ocorre em animais, de modo que ela é um alvo interessante para o desenvolvimento de novos antibióticos.

**Estágio ❸ Condensação de seis unidades de isopreno ativadas para formar esqualeno.** O isopentenil-pirofosfato e o dimetilalil-pirofosfato sofrem, agora, uma condensação "cabeça com cauda", em que um grupo pirofosfato é deslocado, sendo formada uma cadeia de 10 carbonos, o **geranil-pirofosfato** (**Figura 21-36**). (A "cabeça" é a extremidade na qual o pirofosfato está ligado.) O geranil-pirofosfato sofre outra condensação do tipo "cabeça com cauda" com o isopentenil-pirofosfato, gerando um intermediário de 15 carbonos, o **farnesil-pirofosfato**. Finalmente, duas moléculas de farnesil-pirofosfato ligam-se cabeça com cabeça, com a eliminação de ambos os grupos pirofosfato, formando o **esqualeno**.

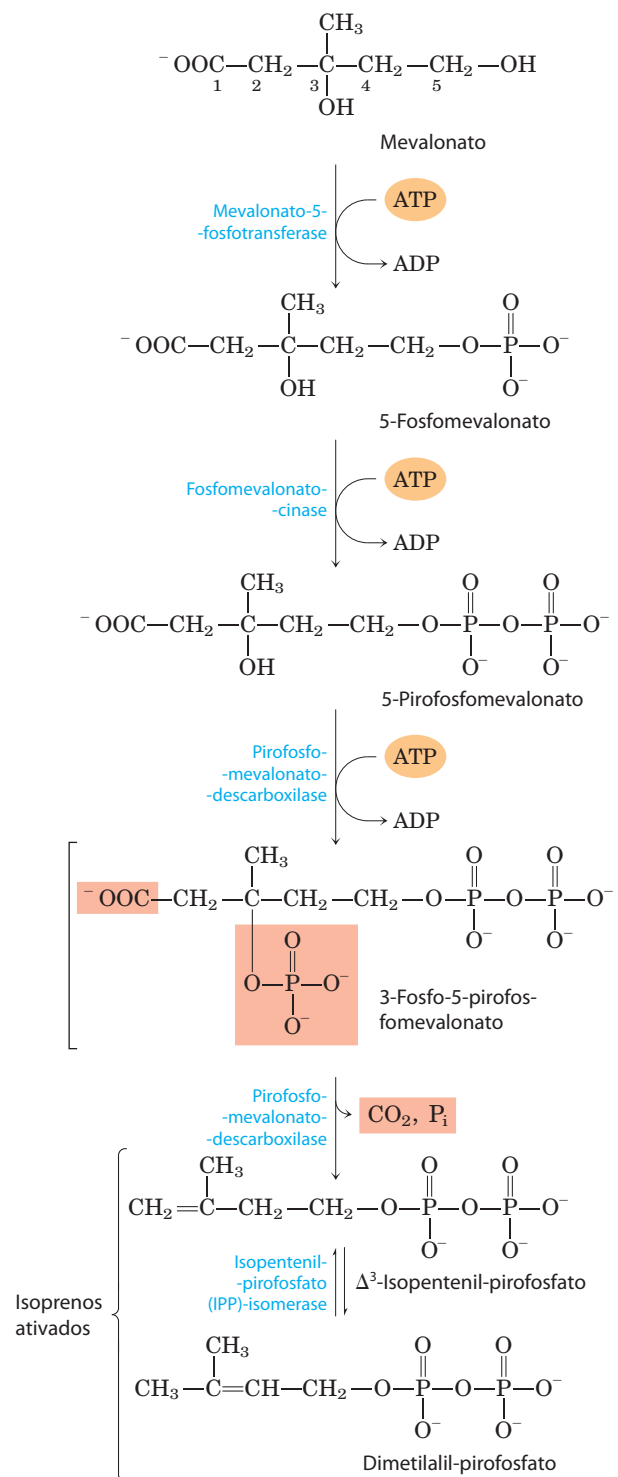



**FIGURA 21-35 Conversão do mevalonato em unidades ativadas de isopreno.** Seis dessas unidades ativadas combinam-se para formar o esqualeno (ver Figura 21-36). Os grupos de saída do 3-fosfo-5-pirofosfomevalonato estão sombreados em cor salmão. O intermediário entre colchetes é hipotético.

Os nomes comuns desses intermediários derivam das fontes das quais eles foram primeiro isolados. O geraniol, um componente do óleo das rosas, tem aroma de gerânios,

Dimetilalil-pirofosfato + $\Delta^3$-Isopentenil-pirofosfato

Preniltransferase (condensação cabeça com cauda) → $PP_i$

Geranil-pirofosfato

Preniltransferase (cabeça com cauda) + $\Delta^3$-Isopentenil-pirofosfato → $PP_i$

Farnesil-pirofosfato

Farnesil-pirofosfato

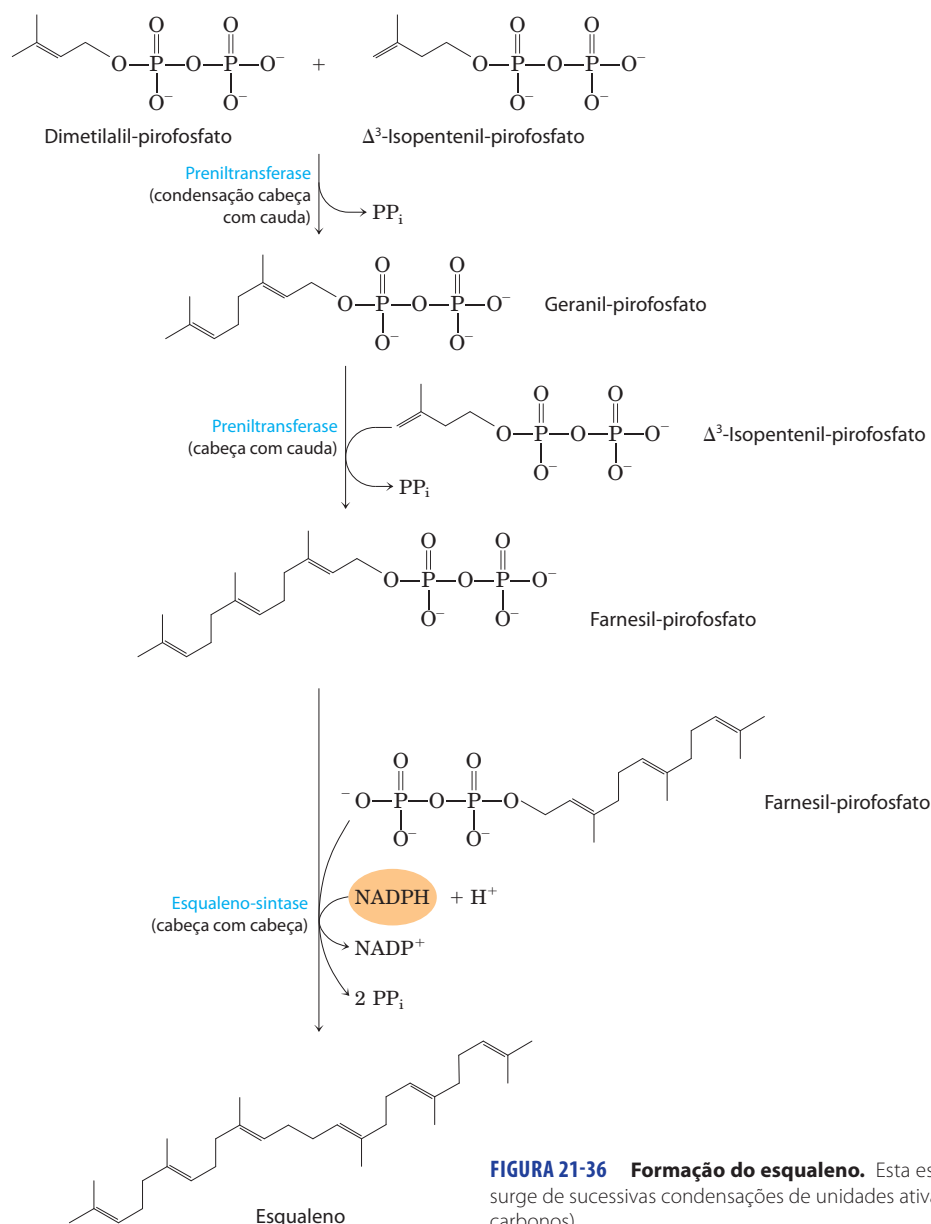
Esqualeno-sintase (cabeça com cabeça): NADPH + $H^+$ → $NADP^+$, 2 $PP_i$

Esqualeno

**FIGURA 21-36 Formação do esqualeno.** Esta estrutura de 30 carbonos surge de sucessivas condensações de unidades ativadas de isopreno (cinco carbonos).

e o farnesol é um composto aromático encontrado nas flores da acácia-amarela (*Acacia farnesiana*). Muitos aromas naturais de origem vegetal são sintetizados a partir de unidades de isopreno. O esqualeno, isolado pela primeira vez do fígado de tubarões (gênero *Squalus*), tem 30 carbonos, 24 na cadeia principal e seis na forma de ramificações de grupos metila.

**Estágio ❹ Conversão do esqualeno no núcleo esteroide de quatro anéis.** Quando a molécula de esqualeno é representada como na **Figura 21-37**, torna-se evidente a relação entre a sua estrutura linear e a estrutura cíclica dos esteróis. Todos os esteróis têm os quatro anéis fundidos que formam o núcleo esteroide, e todos são alcoóis, com um grupo hidroxil em C-3 – daí o nome "esterol". A atividade da **esqualeno-monoxigenase** adiciona um átomo de oxigênio do $O_2$ à extremidade da cadeia do esqualeno, formando um epóxido. Essa enzima é outra oxidase de função mista (Quadro 21-1); NADPH reduz o outro átomo de oxigênio do $O_2$ a $H_2O$. As ligações duplas do produto, o **esqualeno-2,3-epóxido**, estão posicionadas de modo que uma notável reação em concerto é capaz de converter o esqualeno epóxido linear em uma estrutura cíclica. Nas células animais, essa ciclização resulta na formação de **lanosterol**, que contém os quatro anéis característicos do núcleo esteroide. O lanosterol é finalmente convertido em colesterol em uma série de aproximadamente 20 reações, que incluem a migração de alguns grupos metil e a remoção de outros. A elucidação dessa extraordinária via biossintética, uma das mais complexas conhecidas, foi realizada por Konrad Bloch, Feodor Lynen, John Cornforth e George Popják no final da década de 1950.

O colesterol é o esterol característico das células animais. Por sua vez, os vegetais, os fungos e os protistas sintetizam outros esteróis intimamente relacionados; utilizam a

Konrad Bloch, 1912–2000

Feodor Lynen, 1911–1979

John Cornforth, 1917-2013

George Popják, 1914–1998

mesma via sintética até a formação de esqualeno-2,3-epóxido, ponto em que as vias divergem levemente, gerando outros esteróis, como o estigmasterol em muitas plantas e o ergosterol nos fungos (Figura 21-37).

Esqualeno

Esqualeno-monoxigenase

NADPH + $H^+$

$O_2$

$H_2O$

$NADP^+$

Esqualeno-2,3-epóxido

múltiplas etapas (plantas)

Ciclase (animais)

múltiplas etapas (fungos)

Estigmasterol

Ergosterol

Ciclase

Lanosterol

Múltiplas etapas

Colesterol

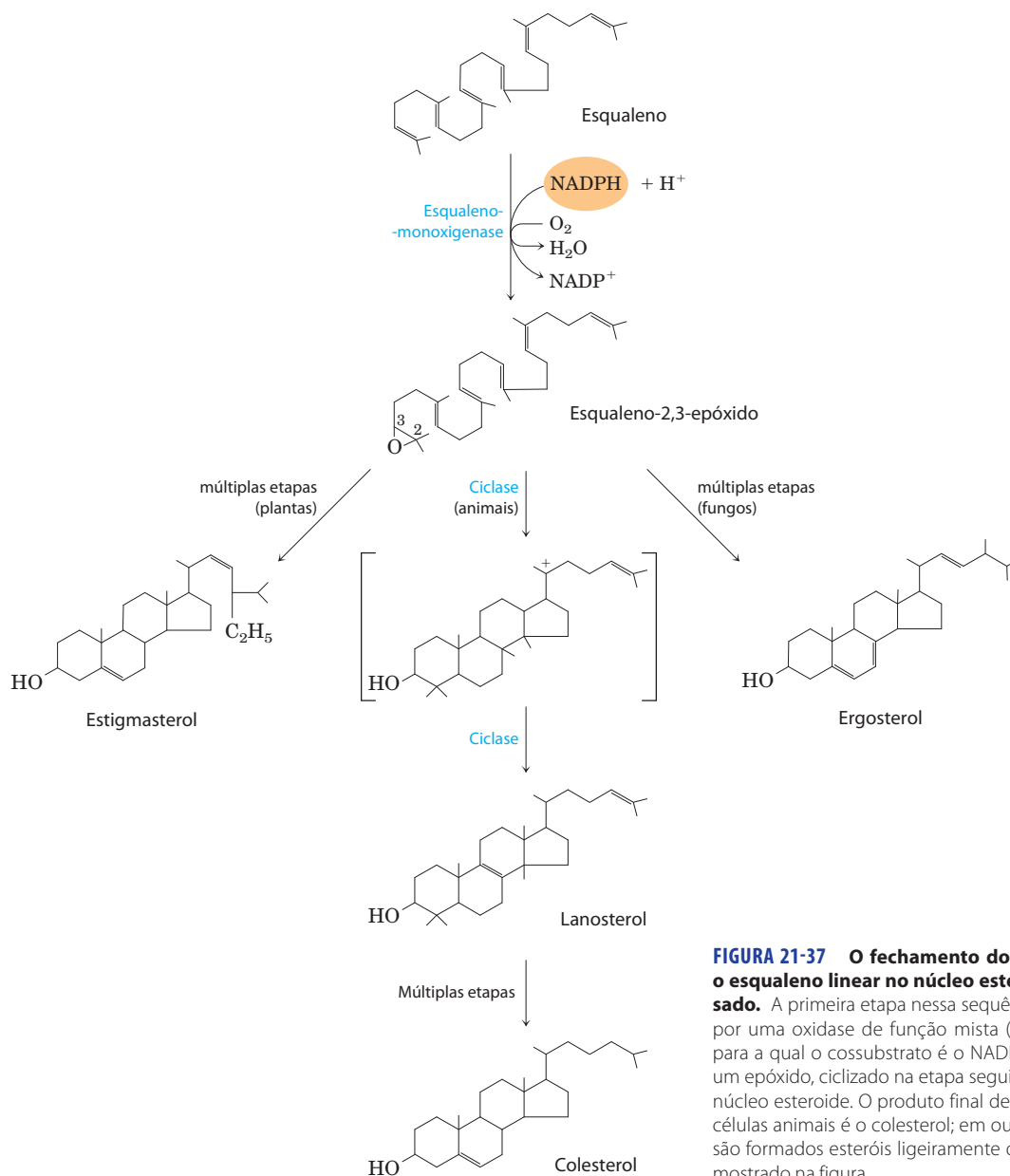



**FIGURA 21-37 O fechamento do anel converte o esqualeno linear no núcleo esteroide condensado.** A primeira etapa nessa sequência é catalisada por uma oxidase de função mista (monoxigenase), para a qual o cossubstrato é o NADPH. O produto é um epóxido, ciclizado na etapa seguinte, formando o núcleo esteroide. O produto final dessas reações nas células animais é o colesterol; em outros organismos são formados esteróis ligeiramente diferentes, como mostrado na figura.

**PROBLEMA RESOLVIDO 21-1** **Custo energético da síntese de esqualeno**

Qual é o custo energético da síntese de esqualeno a partir de acetil-CoA, em número de ATP por molécula de esqualeno sintetizada?

**Solução:** Na via de acetil-CoA a esqualeno, o ATP é consumido apenas nas etapas que convertem mevalonato em isopreno ativado, precursor do esqualeno. Três moléculas de ATP são utilizadas para criar cada um dos seis isoprenos ativados necessários para a construção do esqualeno, em um custo total de 18 moléculas de ATP.

## O colesterol tem destinos diversos

A maior parte da síntese do colesterol em vertebrados ocorre no fígado. Uma pequena fração do colesterol sintetizado ali é incorporada em membranas dos hepatócitos, mas a maior parte dele é exportada em uma de três formas: ácidos biliares, colesterol biliar ou ésteres de colesterila (**Figura 21-38**). Pequenas quantidades de oxiesteróis, como 25-hidroxicolesterol, são formadas no fígado e atuam como reguladores da síntese de colesterol (ver a seguir). Em outros tecidos, o colesterol é convertido em hormônios esteroides (p. ex., no córtex da suprarrenal e nas gônadas, ver Figura 10-19) ou no hormônio vitamina D (i.e., no fígado e nos rins; ver Figura 10-20).Tais hormônios são sinalizadores biológicos extremamente potentes agindo por meio de receptores nucleares proteicos.

Uma das três formas do colesterol exportada do fígado é a bile, um fluido estocado na vesícula biliar e excretado no intestino delgado para auxiliar na digestão de refeições contendo gordura. Seus principais componentes são os **ácidos biliares** e seus sais, ambos relativamente hidrofílicos derivados do colesterol e sintetizados no fígado que servem como agentes emulsificantes no intestino, convertendo partículas grandes de gordura em pequenas micelas, dessa forma aumentando muito a superfície de interação com as lipases digestivas (ver Figura 17-1). A bile também contém quantidades muito menores de colesterol.

Os **ésteres de colesterila** são formados no fígado pela ação da **acil-CoA-colesterol aciltransferase** (**ACAT**). Essa enzima catalisa a transferência de um ácido graxo da coenzima A para o grupo hidroxil do colesterol (Figura 21-38), convertendo o colesterol em uma forma mais hidrofóbica e prevenindo que eles entrem nas membranas. Os ésteres de colesterila são transportados em partículas lipoproteicas secretadas para outros tecidos que utilizam o colesterol ou são armazenados no fígado em gotículas de gorduras.

## O colesterol e outros lipídeos são transportados em lipoproteínas plasmáticas

O colesterol e os ésteres de colesterila, assim como os triacilgliceróis e os fosfolipídeos, são essencialmente insolúveis em água, e ainda assim devem ser transportados do tecido de origem para os tecidos nos quais eles serão armazenados ou consumidos. Para facilitar seu transporte, eles são transportados no plasma sanguíneo como **lipoproteínas plasmáticas**, que são complexos macromoleculares de proteínas transportadoras específicas, chamadas **apolipoproteínas**, e várias combinações de fosfolipídeos, colesterol, ésteres de colesterila e triacilgliceróis.

As apolipoproteínas ("apo" designa a proteína em sua forma livre de lipídeo) combinam-se com os lipídeos, formando diversas classes de partículas lipoproteicas, as quais

Hidroxiesteróis (24-hidroxicolesterol)

Colesterol

Hormônios esteroides (pregnenolona)

Acil-CoA–colesterol aciltransferase (ACAT)

Acil-graxo-CoA

CoA-SH

Ácidos biliares (ácido taurocólico)

Éster de colesterila

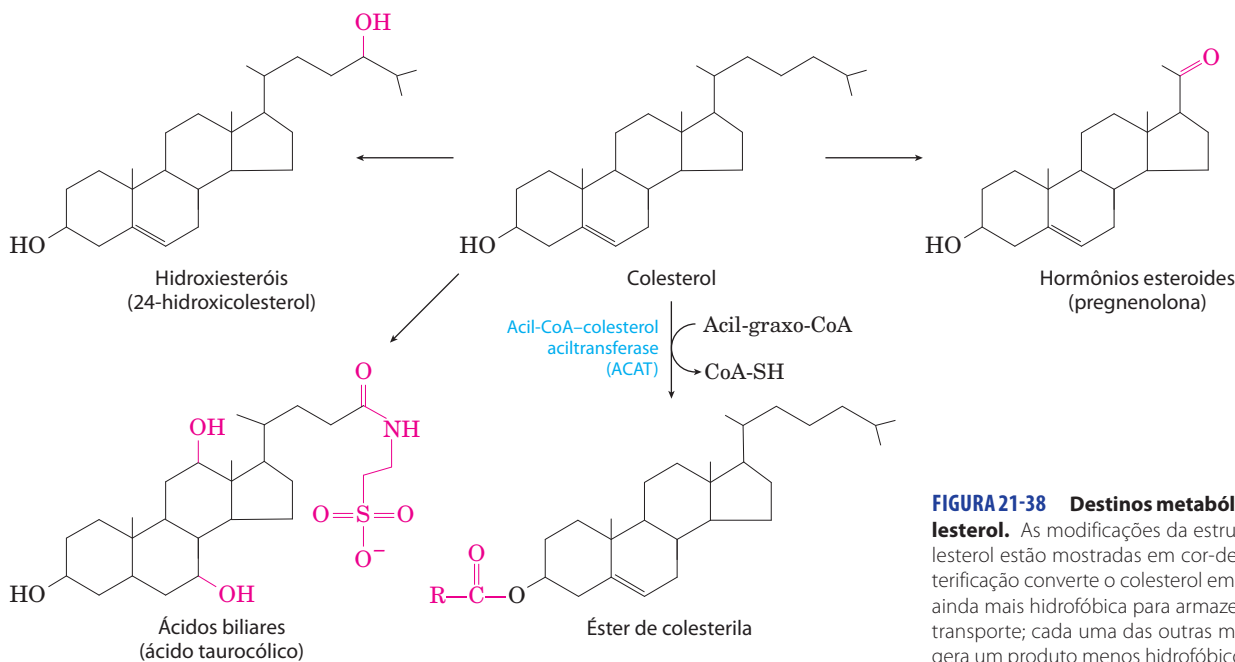



**FIGURA 21-38 Destinos metabólicos do colesterol.** As modificações da estrutura do colesterol estão mostradas em cor-de-rosa. A esterificação converte o colesterol em uma forma ainda mais hidrofóbica para armazenamento e transporte; cada uma das outras modificações gera um produto menos hidrofóbico.

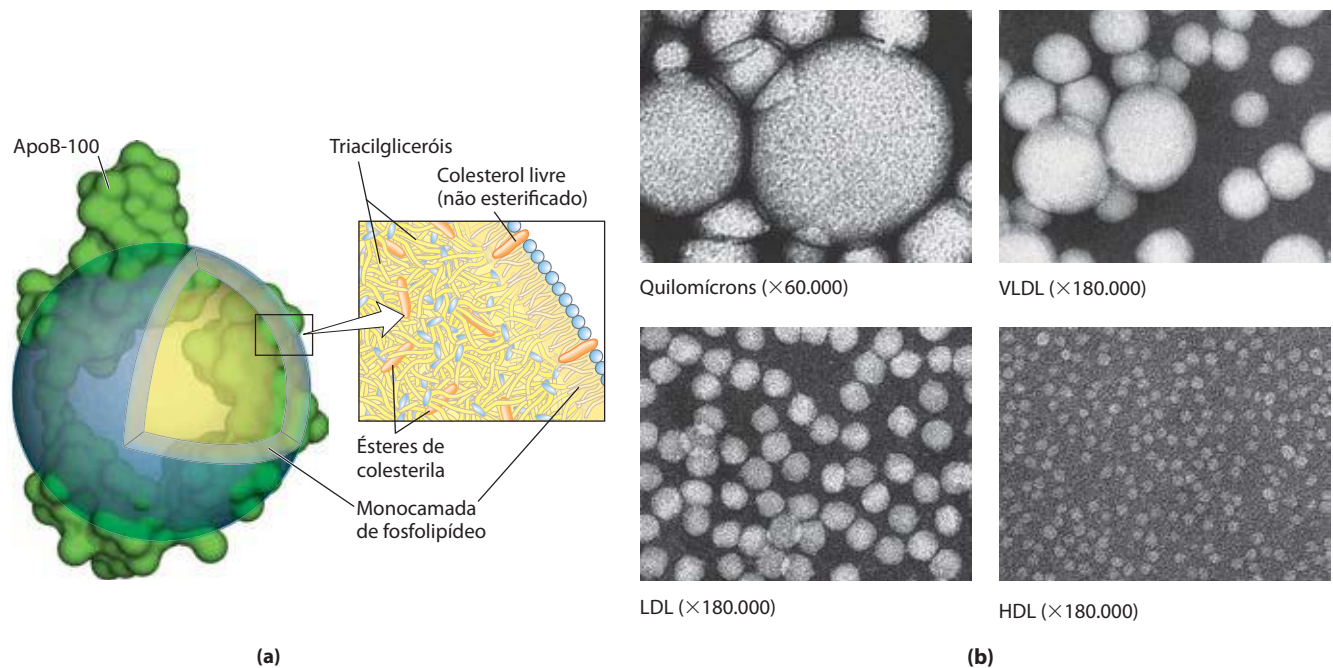



**FIGURA 21-39 Lipoproteínas. (a)** Estrutura de uma lipoproteína de baixa densidade (LDL). A apolipoproteína B-100 (apoB-100) é uma das maiores cadeias polipeptídicas conhecidas, com 4.636 resíduos de aminoácidos ($M_r$ 512.000). Uma partícula de LDL contém um núcleo com aproximadamente 1.500 moléculas de ésteres de colesterila, envolvido por uma camada de cerca de 500 moléculas de colesterol, 800 moléculas de fosfolipídeos e uma molécula de apoB-100. **(b)** Quatro classes de lipoproteínas, visualizadas ao microscópio eletrônico após coloração negativa. No sentido horário, a partir da parte superior à esquerda: quilomícrons, 50 a 200 nm de diâmetro; VLDL, 28 a 70 nm; HDL, 8 a 11 nm; LDL, 20 a 25 nm. Os tamanhos mostrados das partículas são aqueles medidos para essas amostras; os tamanhos das partículas variam consideravelmente em diferentes preparações. Para as propriedades das lipoproteínas, ver Tabela 21-1.

são complexos esféricos com os lipídeos hidrofóbicos no centro e as cadeias laterais hidrofílicas de aminoácidos na superfície (**Figura 21-39a**). As diferentes combinações de lipídeos e proteínas produzem partículas de diferentes densidades, variando de quilomícrons a lipoproteínas de alta densidade. Essas partículas podem ser separadas por ultracentrifugação (Tabela 21-1) e visualizadas por microscopia eletrônica (Figura 21-39b).

Cada classe de lipoproteína tem uma função específica, determinada por seu local de síntese, por sua composição lipídica e por seu conteúdo apolipoproteico. Pelo menos dez apolipoproteínas distintas são encontradas nas lipoproteínas do plasma humano (Tabela 21-2), distinguíveis por seus tamanhos, suas reações com anticorpos específicos e sua distribuição característica nas classes de lipoproteínas. Esses componentes proteicos atuam como sinalizadores, direcionando as lipoproteínas para tecidos específicos ou ativando enzimas que agem nas lipoproteínas. Eles também têm sido envolvidos em doenças; o Quadro 21-2 descreve um elo entre apoE e a doença de Alzheimer. A **Figura 21-40** fornece uma visão geral da formação e transporte das lipoproteínas em mamíferos. As etapas numeradas na discussão que se seguiu referem-se a esta figura.

Os **quilomícrons**, discutidos no Capítulo 17 quando foi analisado o transporte dos triacilgliceróis da dieta, do intestino até os demais tecidos, são as maiores lipoproteínas e as menos densas, contendo alta proporção de triacilgliceróis (ver Figura 17-2). ❶ Os quilomícrons são sintetizados

**TABELA 21-1 Principais classes de lipoproteínas plasmáticas humanas: algumas propriedades**

| | | Composição (% do peso) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Lipoproteína** | **Densidade (g/mL)** | **Proteínas** | **Fosfolipídeos** | **Colesterol livre** | **Ésteres de colesterila** | **Triacilgliceróis** |
| Quilomícrons | < 1,006 | 2 | 9 | 1 | 3 | 85 |
| VLDL | 0,95-1,006 | 10 | 18 | 7 | 12 | 50 |
| LDL | 1,006-1,063 | 23 | 20 | 8 | 37 | 10 |
| HDL | 1,063-1,210 | 55 | 24 | 2 | 15 | 4 |

**Fonte:** Modificada de Kritchevsky, D. (1986) Atherosclerosis and Nutrition. *Nutr. Int.* 2 p. 290-297.

**TABELA 21-2** Apolipoproteínas das lipoproteínas plasmáticas humanas

| Apolipoproteína | Peso molecular do polipeptídeo | Associação a lipoproteínas | Função (quando conhecida) |
|---|---|---|---|
| ApoA-I | 28.100 | HDL | Ativa a LCAT; interage com transportadores ABC |
| ApoA-II | 17.400 | HDL | Inibe a LCAT |
| ApoA-IV | 44.500 | Quilomícrons, HDL | Ativa a LCAT; transporte/depuração de colesterol |
| ApoB-48 | 242.000 | Quilomícrons | Transporte/depuração de colesterol |
| ApoB-100 | 512.000 | VLDL, LDL | Liga-se a receptores de LDL |
| ApoC-I | 7.000 | VLDL, HDL | |
| ApoC-II | 9.000 | Quilomícrons, VLDL, HDL | Ativa a lipase lipoproteica |
| ApoC-III | 9.000 | Quilomícrons, VLDL, HDL | Inibe a lipase lipoproteica |
| ApoD | 32.500 | HDL | |
| ApoE | 34.200 | Quilomícrons, VLDL, HDL | Desencadeia a depuração de VLDL e de remanescentes de quilomícrons |

**Fonte:** Modificada de Vance, D.E. & Vance, J.E. (eds) (2008) *Biochemistry of Lipids and Membranes.* 5th ed. Elsevier Science.

a partir de gorduras da dieta no RE dos enterócitos, células epiteliais que recobrem o intestino delgado. Os quilomícrons então se movem pelo sistema linfático e entram na corrente sanguínea pela veia subclávia esquerda. As apolipoproteínas dos quilomícrons incluem a apoB-48 (exclusiva dessa classe de lipoproteínas), a apoE e a apoC-II (Tabela 21-2). ❷ A apoC-II ativa a lipase lipoproteica nos capilares do tecido adiposo, do coração, do músculo esquelético e da glândula mamária em lactação, permitindo a liberação de ácidos graxos livres (AGL) para esses tecidos. Os quilomícrons, portanto, transportam ácidos graxos da dieta para os tecidos onde eles serão consumidos ou armazenados como combustível. ❸ O que resta dos quilomícrons (após perderem a maior parte de seus triacilgliceróis, mas contendo ainda colesterol, apoE e apoB-48) move-se pela corrente sanguínea para o fígado. Receptores existentes no fígado ligam a apoE nos remanescentes dos quilomícrons e controlam sua captação por endocitose. ❹ No fígado, os remanescentes liberam seu colesterol e são degradados nos lisossomos. Essa via do colesterol da dieta até o fígado é a **via exógena** (setas azuis na Figura 21-40).

Quando a dieta contém mais ácidos graxos e colesterol do que a quantidade necessária para uso imediato como combustível ou como precursores de outras moléculas, eles são ❺ convertidos em triacilgliceróis ou ésteres de colesterila no fígado e empacotados com apolipoproteínas específicas, formando as **lipoproteínas de densidade muito baixa** (**VLDL**, de *very-low density lipoproteins*). O excesso de carboidratos na dieta também pode ser convertido em triacilgliceróis no fígado e exportado como VLDL. Além dos triacilgliceróis e ésteres de colesterila, as VLDL contêm apoB-100, apoC-I, apoC-II, apoC-III e apoE (Tabela 21-2). As VLDL são transportadas pelo sangue do fígado para o músculo e o tecido adiposo. ❻ Nos capilares desses tecidos,

**QUADRO 21-2**  **MEDICINA** **Alelos da ApoE predizem a incidência da doença de Alzheimer**

Nas populações humanas, existem três variantes comuns, ou alelos, do gene que codifica a apolipoproteína E. O mais comum, representando cerca de 78% dos alelos apoE de humanos, é o *APOE3*; os alelos *APOE4* e *APOE2* representam 15 e 7%, respectivamente. O alelo *APOE4* é particularmente comum em humanos com a doença de Alzheimer, e a associação é altamente preditiva. As pessoas que herdam o alelo *APOE4* têm um risco aumentado de apresentarem a doença de Alzheimer de desenvolvimento tardio. Aquelas homozigotas para *APOE4* têm o risco de desenvolver a doença aumentado em 16 vezes; para aquelas que a desenvolvem, a idade média do início da doença é pouco abaixo dos 70 anos. Para aquelas que herdam duas cópias de *APOE3*, ao contrário, a média de idade do início da doença de Alzheimer excede os 90 anos.

A base molecular para a associação entre a apoE-4 e a doença de Alzheimer ainda não é conhecida. Também não está claro como a apoE-4 pode afetar a deposição de fibras amiloides, que parecem ser o principal agente causador da doença (ver Figura 4-32). Especula-se acerca de um possível papel da apoE-4 na estabilização da estrutura do citoesqueleto dos neurônios. As proteínas apoE-2 e apoE-3 ligam-se a diversas proteínas associadas com os microtúbulos neuronais, enquanto apoE-4 não o faz. Isso pode acelerar a morte dos neurônios. Seja qual for o mecanismo que venha a ser confirmado, essas observações prometem expandir nosso conhecimento das funções biológicas das apolipoproteínas.

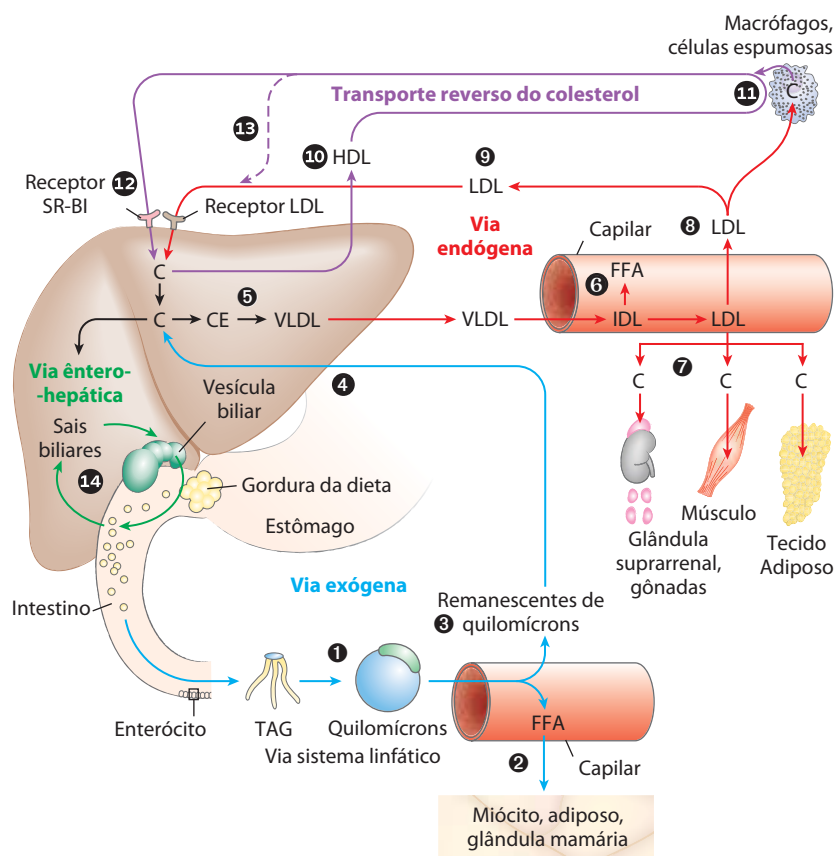



**FIGURA 21-40** **Lipoproteínas e transporte dos lipídeos.** Os lipídeos são transportados na corrente sanguínea como lipoproteínas, existentes em diversas formas variantes, cada uma com diferentes funções e com composições lipídica e proteica distintas (ver Tabelas 21-1 e 21-2), portanto, com densidades diferentes. As etapas numeradas estão descritas no texto. Na via exógena (setas azuis), os lipídeos da dieta são empacotados em quilomícrons; a maior parte do seu conteúdo em triacilgliceróis é liberada pela lipase lipoproteica nos tecidos adiposo e muscular, durante o transporte ao longo dos capilares. Os quilomícrons remanescentes (contendo na maior parte proteínas e colesterol) são captados pelo fígado. Os sais biliares produzidos no fígado auxiliam na dispersão das gorduras da dieta e são, então, reabsorvidos na via êntero-hepática (setas verdes). Na via endógena (setas vermelhas), os lipídeos sintetizados ou empacotados no fígado são distribuídos aos tecidos periféricos pela VLDL. A extração dos lipídeos da VLDL (acompanhada pela perda de parte das apolipoproteínas) converte, gradualmente, parte da VLDL em LDL, que transporta o colesterol para os tecidos extra-hepáticos ou de volta para o fígado. O fígado capta LDL, remanescentes de VLDL (chamadas de lipoproteínas de densidade intermediária, ou IDLs) e os remanescentes de quilomícrons por endocitose mediada por receptor. O excesso de colesterol nos tecidos extra-hepáticos é transportado de volta ao fígado como HDL pelo transporte reverso do colesterol (setas roxas). C representa colesterol; EC representa ésteres de colesterila.

apoC-II ativa a lipase lipoproteica, que catalisa a liberação dos ácidos graxos a partir dos triacilgliceróis das VLDL. Os adipócitos captam esses ácidos graxos, reconvertem-nos em triacilgliceróis e armazenam os produtos em gotículas intracelulares de lipídeos; já os miócitos, ao contrário, primariamente oxidam esses ácidos graxos para obterem energia. Quando o nível de insulina está alto (após uma refeição), as VLDL atuam principalmente para transportar lipídeos da dieta para o tecido adiposo para armazenamento. No estado de jejum ou entre as refeições, os ácidos graxos usados para produzir as VLDL no fígado são originários principalmente do tecido adiposo, e o principal alvo das VLDL são os miócitos do coração e do músculo esquelético.

A perda de triacilgliceróis converte parte da VLDL em remanescentes de VLDL (também chamadas de lipoproteínas de densidade intermediária, IDL, de *intermediate density lipoproteins*). A remoção adicional de triacilgliceróis da IDL (remanescentes) produz **lipoproteínas de baixa densidade** (**LDL**, de *low-density lipoproteins*). Rica em colesterol e ésteres de colesterila e contendo apoB-100 como sua principal apolipoproteína, a ❼ LDL transporta colesterol para os tecidos extra-hepáticos, como músculo, glândulas suprarrenais e tecido adiposo. Esses tecidos têm receptores na membrana plasmática que reconhecem a apoB-100 e controlam a captação de colesterol e ésteres de colesterila. ❽ A LDL também entrega colesterol para os macrófagos, algumas vezes os convertendo em células espumosas (ver Figura 21-46). ❾ A LDL não captada pelos tecidos periféricos retornam ao fígado onde são captados via **receptores de LDL** na membrana plasmática dos hepatócitos. O colesterol que entra no hepatócito por essa via pode ser incorporado nas membranas, convertido em ácidos biliares ou reesterificados pela ACAT (Figura 21-38) para armazenamento nas gotículas lipídicas citosólicas. Essa via, da formação de VLDL no fígado ao retorno de LDL para o fígado é a **via endógena** do metabolismo e transporte do colesterol (setas vermelhas na Figura 21-40). O acúmulo do excesso de colesterol intracelular é prevenido pela diminuição da velocidade de síntese quando colesterol suficiente está disponível a partir de LDL no sangue. Mecanismos re-

gulatórios desse processo estão descritos abaixo. A Figura 21-40 e outras vias de transporte de lipoproteínas serão reanalisadas após a discussão da captação de LDL pelas células.

## Os ésteres de colesterila entram na célula por endocitose mediada por receptor

Cada partícula de LDL na corrente sanguínea contém apoB-100, a qual é reconhecida por receptores de LDL presentes na membrana plasmática de células que precisam captar colesterol. A **Figura 21-41** mostra tais células, em que ❶ receptores de LDL são sintetizados no aparelho de Golgi e são transportados para a membrana plasmática, onde ficam disponíveis para ligar apoB-100. ❷ A ligação da LDL ao receptor de LDL inicia a endocitose, que ❸ transfere a LDL e o seu receptor para o interior da célula dentro de um endossomo. ❹ As porções da membrana do endossomo que contêm o receptor brotam na membrana plasmática e os receptores retornam à superfície celular, para funcionar de novo na captação de LDL. ❺ O endossomo funde-se com um lisossomo, o qual ❻ contém enzimas que hidrolisam os ésteres de colesterila, liberando colesterol e ácidos graxos no citosol. A proteína apoB-100 também é degradada em aminoácidos, liberados para o citosol. A apoB-100 também está presente na VLDL, mas o seu domínio de ligação ao receptor não está disponível para a interação com o receptor de LDL; a conversão de VLDL em LDL expõem o domínio de ligação ao receptor da apoB-100.

Essa via para o transporte de colesterol no sangue e sua **endocitose mediada por receptor** nos tecidos-alvo foi elucidada por Michael Brown e Joseph Goldstein. Eles descobriram que indivíduos com a doença genética **hipercolesterolemia familiar** (**HF**) têm mutações no receptor de LDL, que previne a captação normal de LDL pelo fígado e pelos tecidos periféricos. O resultado da captação defeituosa de LDL são níveis muito altos de LDL no sangue (e de colesterol que ela carrega). Indivíduos com HF têm

Michael Brown e Joseph Goldstein

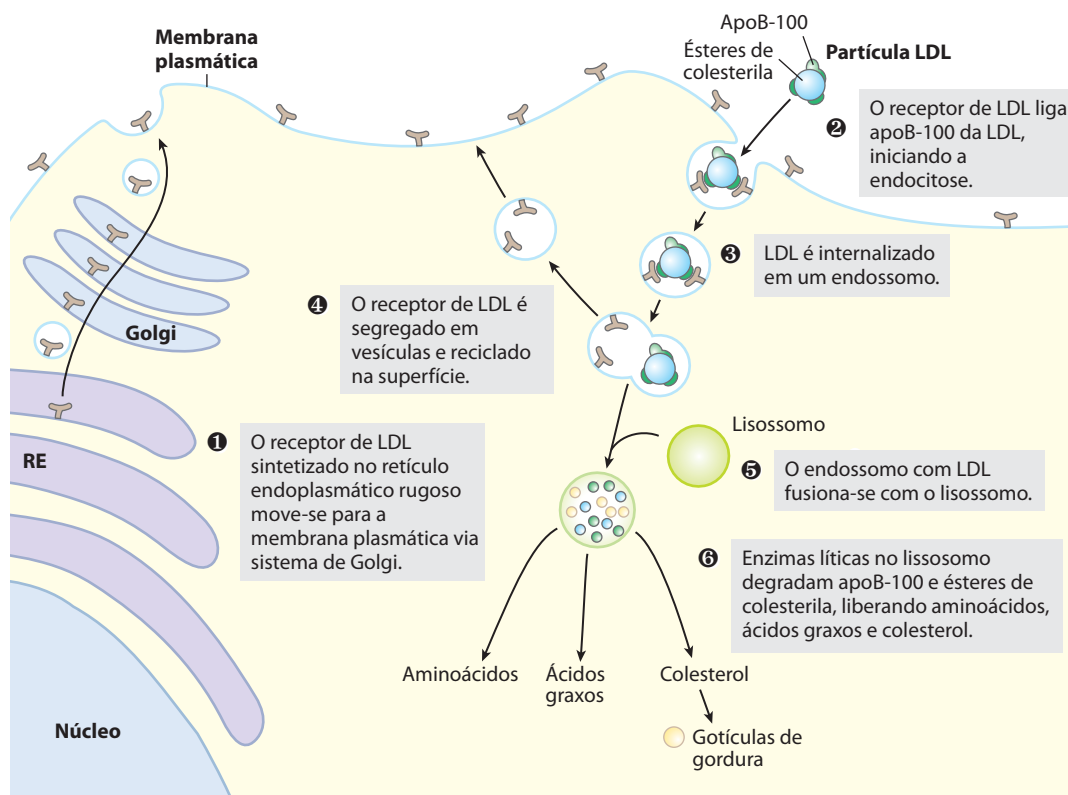



**FIGURA 21-41 Captação do colesterol por endocitose mediada por receptor.**

probabilidade muito aumentada de desenvolver aterosclerose, doença do sistema cardiovascular em que os vasos sanguíneos são ocluídos por placas ricas em colesterol (ver Figura 21-46).

A doença de **Niemann-Pick tipo C** (**NPC**) é um defeito hereditário no armazenamento de lipídeos, em que o colesterol não é transportado para fora dos lissosomos e, ao contrário, acumula nos lissosomos do fígado, cérebro e pulmões, levando a morte prematura. A NPC é o resultado de uma mutação em um dos dois genes (*NPC1, NPC2*) essenciais para mover o colesterol pra fora do lissosomo e para o citosol, onde ele pode ser metabolizado. O *NPC1* codifica uma proteína lissosomal transmembrana, e o *NPC2* codifica uma proteina solúvel. Essas proteínas atuam em sequência para transferir colesterol para fora do lissosomo e para o citosol para o processamento adicional ou metabolismo. ■

## O HDL realiza o transporte reverso de colesterol

A quarta das principais lipoproteínas em mamíferos, a **lipoproteína de alta densidade** (**HDL**, de *high-density lipoprotein*), origina-se no fígado e no intestino delgado como pequenas partículas ricas em proteína que contêm relativamente pouco colesterol e não contêm ésteres de colesterila (10, Figura 21-40). As HDL contêm principalmente apoA-I e outras apolipoproteínas (Tabela 21-2). Elas contêm também a enzima **lecitina-colesterol-aciltransferase** (**LCAT**), que catalisa a formação de ésteres de colesterila a partir de lecitina (fosfatidilcolina) e de colesterol (**Figura 21-42**). A LCAT na superfície das partículas de HDL nascentes (recém-formadas) converte o colesterol e a fosfatidilcolina dos remanescentes do quilomícron e da VLDL encontradas na corrente sanguínea em ésteres de colesterila, dando início à formação do núcleo da HDL, transformando a HDL nascente em forma de disco em uma partícula de HDL madura de forma esférica. 11 A HDL nascente também pode captar colesterol de células extra-hepáticas ricas em colesterol (inclusive de macrófagos e de células espumosas formadas a partir dele; ver a seguir). 12 A HDL madura então retorna ao fígado, onde o colesterol é descarregado por meio do receptor SR-BI. 13 Parte dos ésteres de colesterila no HDL também pode ser transferida ao LDL pela proteína transportadora de éster de colesterila. O circuito da HDL é o **transporte reverso do colesterol** (setas roxas na Figura 21-40). A maior parte desse colesterol é convertido em sais biliares no fígado e armazenado na vesícula biliar. Quando uma refeição é ingerida, os sais biliares são excretados no intestino, onde ele dispersa pedaços macroscópicos de gordura em micelas microscópicas que podem ser atacadas pelas lipases. Os sais biliares são reabsorvidos pelo fígado 14 e recirculam pela vesícula biliar na **circulação êntero-hepática** (setas verdes na Figura 21-40).

O mecanismo pelo qual o esterol é descarregado no fígado e em outros tecidos via receptor SR-BI não envolve endocitose, o mecanismo usado para captação de LDL. Em vez disso, quando HDL se liga aos receptores SR-BI na membrana plasmática dos hepatócitos ou de tecidos esteroidogênicos, como a glândula suprarrenal, esses receptores controlam a transferência parcial e seletiva do colesterol e de outros lipídeos do HDL para a célula. A HDL descarregada então se dissocia e recircula na corrente sanguínea para extrair mais lipídeos dos remanescentes de quilomícrons e VLDL e de células sobrecarregadas com colesterol, como descrito abaixo.

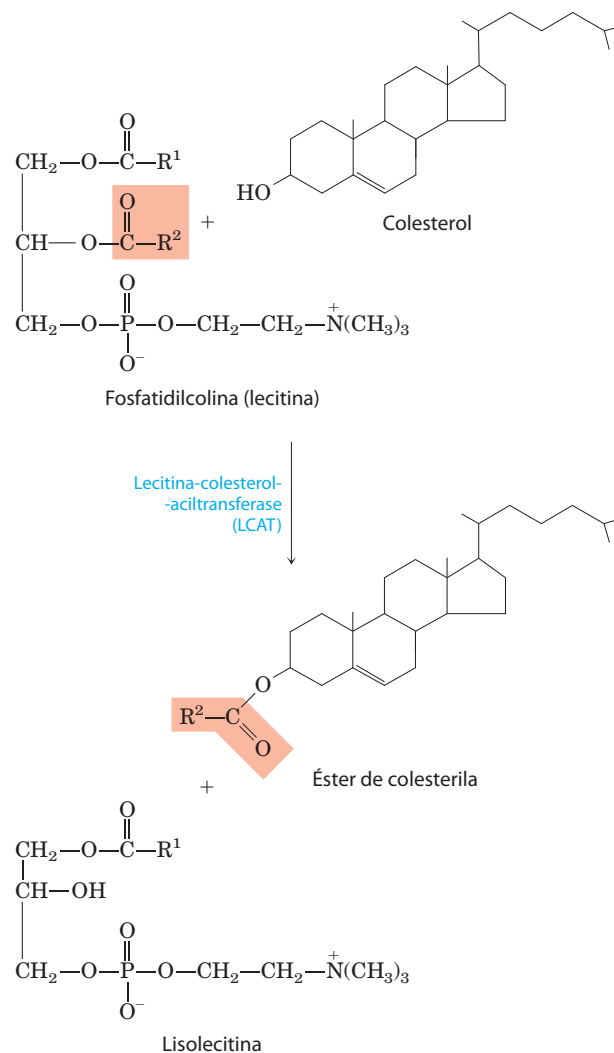



**FIGURA 21-42 As reações catalisadas pela lecitina-colesterol-aciltransferase (LCAT).** Essa enzima está presente na superfície da HDL e é estimulada pelo componente apoA-I da HDL. Os ésteres de colesterila acumulam-se nas HDL nascentes, convertendo-as em HDL maduras.

## A síntese e o transporte do colesterol são regulados em vários níveis

A síntese de colesterol é um processo complexo e grande consumidor de energia. O excesso de colesterol não pode ser catabolizado para o uso como combustível, e deve, por conseguinte, ser excretado. Portanto, é claramente vantajoso para um organismo regular a biossíntese de colesterol para complementar a quantidade ingerida na dieta. Nos mamíferos, a produção do colesterol é regulada pela concentração intracelular de colesterol e pelos hormônios glucagon e insulina. A etapa comprometida na via de síntese do colesterol (e o principal local de regulação) é a conversão de HMG-CoA em mevalonato (Figura 21-34), a reação catalisada pela HMG-CoA-redutase.

A regulação de curto prazo da *atividade* da HMG-CoA redutase existente é realizada por alteração covalente reversível – fosforilação pela proteína-cinase dependente de AMP (AMPK), sensível à alta concentração de AMP (indicando baixa concentração de ATP). Assim, quando os níveis de ATP declinam, a síntese de colesterol desacelera, e as vias catabólicas para a geração de ATP são estimuladas (**Figura 21-43**). Os hormônios que controlam a regulação global do metabolismo de lipídeos e carboidratos também atuam sobre a HMG-CoA-redutase; o glucagon estimula a sua fosforilação (inativação), e a insulina promove a desfosforilação, ativando a enzima e favorecendo a síntese de colesterol. Esses mecanismos regulatórios covalentes provavelmente não são tão importantes quantitativamente como os mecanismos que afetam a síntese e a degradação da enzima.

Em longo prazo, o *número de moléculas* de HMG-CoA-redutase aumenta ou diminui em resposta às concentrações celulares de colesterol. A regulação da síntese de HMG-CoA-redutase é mediada por um sistema elegante de regulação da transcrição do gene da HMG-CoA (**Figura 21-44**). Esse gene, junto com mais de 20 outros genes que codificam enzimas que atuam na captação e na síntese do colesterol e dos ácidos graxos insaturados, é controlado por uma pequena família de proteínas **chamadas proteínas de ligação aos elementos reguladores de esterol** (**SREBP**, de *sterol regulatory element-binding proteins*). Quando recém-sintetizadas, essas proteínas estão inseridas no RE. Apenas o fragmento solúvel do domínio regulatório de uma SREBP atua como ativador da transcrição gênica, utilizando mecanismos discutidos no Capítulo 28. Quando os níveis de colesterol e oxiesterol estão altos, as SREBP são mantidas no RE e complexadas a outra proteína, chamada de **proteína ativadora da clivagem da SREBP** (**SCAP**, de *SREBP cleavage-activating protein*), que, por sua vez, está ancorada à membrana do RE por sua interação com uma terceira proteína de membrana, a **Insig** (de ***i****nsulin-****i****nduced* ***g****ene* ***p****rotein*) (Figura 21-44a). A SCAP e a Insig atuam como sensores de esterol. Quando os

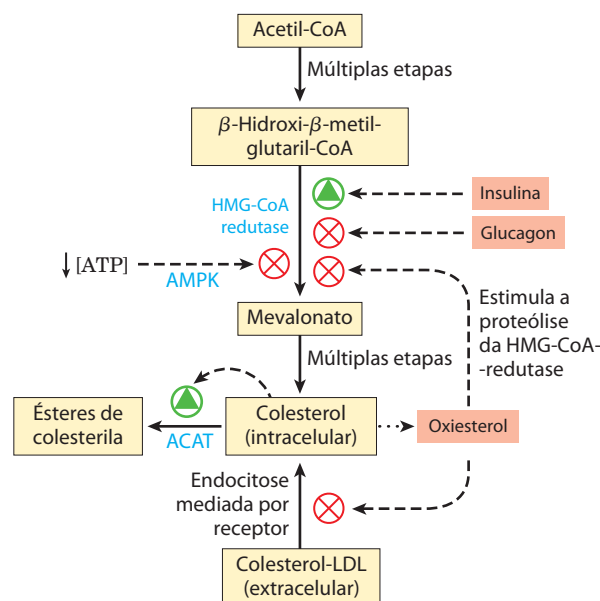



**FIGURA 21-43 A regulação da formação de colesterol equilibra a sua síntese com a captação a partir da alimentação e o estado energético.** A insulina promove a desfosforilação (ativação) da HMG-CoA redutase; glucagon promove sua fosforilação (inativação); e a proteína cinase dependente de AMP, AMPK, quando ativada por baixa [ATP] em relação a [AMP], a fosforila inativando-a. Oxiesteróis metabólitos de colesterol (p. ex., 24(*S*)-hidroxicolesterol) estimula a proteólise da HMG-CoA redutase.

**FIGURA 21-44 Regulação da síntese de colesterol por SREBP.** As proteínas de ligação aos elementos reguladores de esterol (SREBP, mostradas em verde) estão embutidas no RE quando recém-sintetizadas, complexadas com a proteína ativadora da clivagem de SREBP (SCAP, em cor-de-rosa), que, por sua vez, está ligada à Insig (azul). (*N* e *C* representam as extremidades amino e carbóxi das proteínas.) **(a)** Quando ligadas à SCAP e Insig, as SREBP estão inativas. **(b)** Quando os níveis de esterol diminuem, os sítios de ligação a esterol na Insig e na SCAP estão desocupados, o complexo migra para o sistema de Golgi e a SREBP é clivada gerando um domínio regulatório, que **(c)** age no núcleo, aumentando a transcrição de genes regulados por esterol. Insig é direcionada para degradação pelo acoplamento de várias moléculas de ubiquitina.

níveis de esteróis estão altos, o complexo Insig-SCAP-SREBP permanece retido na membrana do RE. Quando os níveis de esteróis dentro da célula declinam (Figura 21-44b), o complexo SCAP-SREBP é escoltado por proteínas secretórias para o aparelho de Golgi, onde duas clivagens proteolíticas de SREBP liberam um fragmento regulatório, que entra no núcleo e ativa a transcrição dos seus genes-alvo, incluindo a HMG-CoA redutase, o receptor de LDL e muitas outras proteínas necessárias para a síntese de lipídeos. Quando os níveis de esteróis aumentam suficientemente, a liberação proteolítica do domínio aminoterminal da SREBP é novamente bloqueada, e a degradação proteossômica do domínio ativo existente resulta em rápido desligamento dos genes-alvos.

Em longo prazo, o nível da HMG-CoA-redutase também é regulado por degradação proteolítica da enzima. Altos níveis de colesterol celular são detectados pela Insig, que dispara o acoplamento de moléculas de ubiquitina à HMG-CoA-redutase, levando à sua degradação pelo proteossomo (ver Figura 27-48).

**Receptor hepático X** (**RHX**) é um fator de transcrição nuclear ativado por ligantes oxiesteróis (refletindo os altos níveis de colesterol), que integra o metabolismo dos ácidos graxos e da glicose. RHXα é expresso principalmente no fígado, no tecido adiposo e nos macrófagos; RHXβ está presente em todos os tecidos. Quando ligado a um oxiesterol, os RHX formam heterodímeros com um segundo tipo de receptor nuclear, os **receptores X de retinoides** (**RXR**), e o dímero RHX-RXR ativa a transcrição de um grupo de genes (**Figura 21-45**) incluindo aquele da acetil-CoA carboxilase (a primeira enzima da síntese dos ácidos graxos); da ácido graxo-sintase; a enzima do citocromo P-450 CYP7A1, necessária para conversão de esterol em ácido biliar; das apoproteínas envolvidas no transporte de colesterol (apoC-I, apoC-II, apoD e apoE); dos transportadores ABC ABCA1 e ABCG1, envolvidos no transporte reverso do colesterol (ver a seguir); de GLUT4, o transportador de glicose estimulado por insulina no músculo e no tecido adiposo; e de SREBP1C. Os reguladores transcricionais RHX e SREBP, portanto, trabalham juntos para alcançar e manter a homeostasia do colesterol; as SREBP são ativadas por baixos níveis de colesterol celular, e os RHX são ativados por altos níveis de colesterol.

**FIGURA 21-45 Atuação do dímero RXR-RHX sobre a expressão de genes do metabolismo de lipídeos e da glicose.** Quando seus ligantes estão ausentes, RXR e RHX associam-se a uma proteína correpressora, prevenindo a transcrição dos genes associados ao elemento do RHX (RHXE). Quando os seus respectivos ligantes estão presentes (9-*cis*-ácido retinoico para RXR; colesterol ou oxiesteróis para RHX) o dímero se dissocia do correpressor, e então associa-se a uma proteína coativadora. Este complexo se liga ao elemento RHX e aciona a expressão dos genes associados. A regulação da expressão gênica é um tópico discutido em mais detalhes no Capítulo 28.

Finalmente, dois outros mecanismos regulatórios influenciam o nível de colesterol celular: (1) altas concentrações intracelulares de colesterol ativam a ACAT, que aumenta a esterificação do colesterol para o armazenamento, e (2) o alto nível de colesterol celular diminui (via SREBP) a transcrição do gene que codifica o receptor de LDL, reduzindo a produção do receptor e, assim, a captação de colesterol do sangue.

## A desregulação do metabolismo de colesterol pode levar à doença cardiovascular

Quando a soma do colesterol sintetizado e do colesterol obtido na dieta excede a quantidade necessária para a síntese de membranas, sais biliares e esteroides, o acúmulo patológico de colesterol (placas) pode obstruir os vasos sanguíneos, condição chamada **aterosclerose**. A falência cardíaca devido à oclusão das artérias coronárias é a principal causa de morte nas sociedades industrializadas. A aterosclerose está relacionada a altos níveis de colesterol no sangue e particularmente a altos níveis de colesterol LDL 1 (“mau colesterol”); existe uma correlação *negativa* entre o nível de HDL (“bom colesterol”) e doença arterial. A formação de placa nos vasos sanguíneos é iniciada quando o LDL contendo grupos acil-graxo parcialmente oxidados adere-se e acumula-se na matriz extracelular das células epiteliais que revestem as artérias (**Figura 21-46**). Células do sistema imune (monócitos) são atraídas para a região onde há acúmulo de LDL, e elas se diferenciam em macrófagos, que captam o LDL oxidado e o colesterol que eles contêm. Os macrófagos não podem limitar a captação de esteróis, e com o aumento do acúmulo de ésteres de colesterila e colesterol livre, os macrófagos se tornam **células espumosas** (parecem espuma no microscópio). Com o acúmulo de colesterol livre nas células espumosas e em suas membranas, elas sofrem apoptose. Durante longos períodos de tempo, as artérias se tornam progressivamente ocluídas, já que as placas, consistindo em material da matriz extracelular, tecido cicatricial formado por tecido muscular liso, e células espumosas remanescentes, gradualmente se tornam maiores. Ocasionalmente, uma placa se solta do local de sua formação e é transportada pelo sangue para uma região mais estreita de uma artéria no cérebro ou no coração, causando o acidente vascular cerebral ou infarto.

Na hipercolesterolemia familiar, os níveis de colesterol sanguíneo são extremamente elevados e uma ateroscle-

**FIGURA 21-46** **Papel das células espumosas na formação das placas ateroscleróticas.**

## QUADRO 21-3  MEDICINA A hipótese lipídica e o desenvolvimento das estatinas

A doença cardíaca coronariana é a principal causa de morte nos países em desenvolvimento. As artérias coronárias que trazem o sangue para o coração sofrem um estreitamento devido à formação de depósitos de gordura chamados de placas ateroscleróticas (contendo colesterol, proteínas fibrosas, depósitos de cálcio, plaquetas sanguíneas e restos celulares). O estabelecimento da conexão entre oclusão arterial (aterosclerose) e níveis de colesterol no sangue foi um projeto do século XX, estimulando uma disputa que foi resolvida apenas com o desenvolvimento de fármacos efetivos na redução do colesterol. O Framingham Heart Study, estudo longitudinal iniciado em 1948 e em continuidade ainda hoje, tem como objetivo identificar os fatores relacionados com doença cardiovascular. Cerca de 5.000 participantes da cidade de Framingham, Massachusetts, foram submetidos a exames físicos periódicos e entrevista sobre o estilo de vida. Em 2002, os participantes da terceira geração foram incluídos no estudo. Esse estudo monumental levou a identificação de fatores de risco para doenças cardiovascular, incluindo tabagismo, obesidade, sedentarismo, diabetes, pressão arterial alta e alto nível de colesterol no sangue.

Em 1913, N. N. Anitschkov, patologista experimental em São Petersburgo, Rússia, publicou um estudo mostrando que coelhos alimentados com dieta rica em colesterol desenvolviam lesões muito semelhantes às placas ateroscleróticas observadas em humanos idosos. Anitschkov continuou seu trabalho ao longo das décadas seguintes, publicando-o em jornais importantes do ocidente. No entanto, seu trabalho não foi aceito como um modelo para a aterosclerose humana, devido ao predomínio do ponto de vista de que a doença era uma simples consequência da idade e que não poderia ser prevenida. A ligação entre colesterol sérico e aterosclerose (a hipótese lipídica) foi gradualmente ganhando força, até que alguns pesquisadores, na década de 1960, sugeriram abertamente que a intervenção terapêutica poderia ser útil. No entanto, a controvérsia persistiu até a publicação, em 1984, dos resultados de um grande estudo sobre a redução do colesterol, patrocinado pelo United States National Institutes of Health, o primeiro teste para a prevenção de doenças coronarianas. Esse estudo mostrou de modo conclusivo uma diminuição estatisticamente significativa em ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais em consequência da diminuição do nível do colesterol. O estudo fez uso de uma resina ligadora de ácido biliar, a colestiramina, para controlar o colesterol. Os resultados estimularam a busca por intervenções terapêuticas mais efetivas. Alguma controvérsia persistiu até o desenvolvimento das estatinas entre o final da década de 1980 e na década de 1990.

O Dr. Akira Endo, trabalhando na companhia Sankyo em Tóquio, descobriu a primeira estatina e relatou o trabalho em 1976. Endo estava estudando o metabolismo do colesterol por algum tempo, e especulou, em 1971, se os fungos estudados para a descoberta de novos antibióticos poderiam produzir também um inibidor da síntese do colesterol. Ao longo de um período de vários anos ele estudou mais de 6.000 culturas de fungos até que um resultado positivo foi encontrado. O composto encontrado foi chamado de compactina (Figura Q-1). O composto afinal provou ser efetivo na redução dos níveis de colesterol em cães e em macacos, e o trabalho chamou a atenção de Michael Brown e Joseph Goldstein, da escola de medicina da

HO, $COO^-$, OH, O, $R_1$, O, $CH_3$, $CH_3$, $R_2$

HO, $H_3C$, $COO^-$, OH

Mevalonato

| | | |
|---|---|---|
| $R_1$ = H | $R_2$ = H | Compactina |
| $R_1$ = $CH_3$ | $R_2$ = $CH_3$ | Sinvastatina (Zocor) |
| $R_1$ = H | $R_2$ = OH | Pravastatina (Pravacol) |
| $R_1$ = H | $R_2$ = $CH_3$ | Lovastatina (Mevacor) |

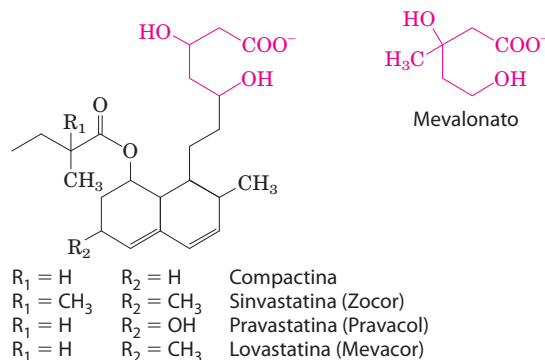



**FIGURA Q-1** **As estatinas como inibidores da HMG-CoA-redutase.** Uma comparação das estruturas do mevalonato e de quatro compostos farmacêuticos (estatinas) que inibem a HMG-CoA-redutase.

rose grave desenvolve-se na infância. Essas pessoas têm o receptor de LDL defeituoso e não apresentam a captação mediada por receptor do colesterol transportado pela LDL. Consequentemente, o colesterol não é retirado do sangue; ele acumula-se nas células espumosas e contribui para a formação das placas ateroscleróticas. A síntese do colesterol endógeno continua, apesar da quantidade excessiva de colesterol no sangue, já que o colesterol extracelular não pode entrar nas células para regular a síntese intracelular (Figura 21-44). Uma classe de fármacos chamada de **estatinas**, alguns isolados de fontes naturais e alguns sintetizados pela indústria farmacêutica, é utilizada no tratamento de pacientes com hipercolesterolemia familiar e com outras condições envolvendo níveis séricos elevados de colesterol. As estatinas assemelham-se ao mevalonato (Quadro 21-3) e são inibidores competitivos da HMG-CoA-redutase. ■

## O transporte reverso do colesterol por HDL se opõe à formação da placa e da aterosclerose

O HDL tem um papel crucial na via do transporte reverso do colesterol (**Figura 21-47**), reduzindo o potencial dano na formação das células espumosas. O HDL esgotado (com baixo nível de colesterol) captura o colesterol armazenado nos tecidos extra-hepáticos (incluindo de células espumosas de placas nascentes) e o transporta para o fígado. Dois transportadores que ligam ATP (ABC) estão envolvidos na saída de colesterol das células espumosas. Nesse processo, apoA-I interage com o transportador ABC (ABCA1) em uma célula rica em colesterol. ABCA-1 transporta uma fração do colesterol de dentro da célula para a superfície externa da membrana plasmática, onde apoA-I livre de lipídeos ou pobre em lipídeos o captura e o transporta para o fígado. Outro transportador ABC (ABCG1) interage com

Akira Endo

Alfred Alberts

P. Roy Vagelos

Universidade do Texas-Southwestern. Brown e Goldstein começaram a trabalhar com Endo e confirmaram seus resultados. Alguns resultados drásticos dos primeiros testes clínicos limitados convenceram diversas indústrias farmacêuticas a unirem-se à busca por estatinas. Uma equipe da Merck, liderada por Alfred Alberts e P. Roy Vagelos, iniciou uma triagem de culturas de fungos e encontrou um resultado positivo após a triagem de apenas 18 culturas. A nova estatina foi chamada de lovastatina (Figura Q-1). Um rumor de que a compactina, em altas doses, era carcinogênica em cães quase marginalizou a corrida para desenvolver as estatinas em 1980, mas os benefícios aos pacientes com hipercolesterolemia familiar já eram evidentes. Depois de muitas consultas a especialistas ao redor do mundo e ao setor de controle de drogas e alimentos nos Estados Unidos (Food and Drug Administration), a Merck prosseguiu cuidadosamente na produção da lovastatina. Testes intensos ao longo das duas décadas seguintes não revelaram efeitos carcinogênicos da lovastatina ou das novas gerações de estatinas que surgiram desde então.

As estatinas inibem a HMG-CoA-redutase, em parte por mimetizarem a estrutura do mevalonato (Figura Q-1), e, assim, inibirem a síntese do colesterol. O tratamento com lovastatina diminui o colesterol sérico em até 30% em pessoas com hipercolesterolemia resultante de uma cópia defeituosa do gene para o receptor de LDL. Quando combinado com uma resina que pode ser ingerida e que liga ácidos biliares e previne sua absorção pelo intestino, o fármaco é ainda mais efetivo.

As estatinas são, atualmente, os fármacos mais amplamente utilizados para a redução do nível do colesterol sérico. Os efeitos colaterais são sempre uma preocupação quando se utilizam fármacos, mas as estatinas representam um caso em que muitos dos efeitos colaterais são positivos. Esses fármacos podem melhorar o fluxo sanguíneo, aumentar a estabilidade das placas ateroscleróticas (de modo que elas não rompem, obstruindo o fluxo sanguíneo), reduzir a agregação plaquetária e inibir a inflamação vascular. Alguns desses efeitos ocorrem antes da redução dos níveis do colesterol em pacientes ingerindo estatinas pela primeira vez, e podem estar relacionados a uma inibição secundária da síntese de isoprenoides pelas estatinas. No entanto, nem todos os efeitos das estatinas são positivos. Em alguns pacientes, geralmente entre aqueles ingerindo estatinas em combinação com outros fármacos redutores do colesterol, ocorre dor ou fraqueza muscular que podem tornar-se graves ou até mesmo debilitantes. Uma lista razoavelmente longa de outros efeitos colaterais tem sido documentada em pacientes, no entanto a maioria é rara. Para a maior parte dos pacientes, entretanto, o decréscimo mediado pelas estatinas nos riscos associados com as doenças coronarianas pode ser significativo. Como todos os medicamentos, as estatinas devem ser utilizadas apenas sob recomendação médica.

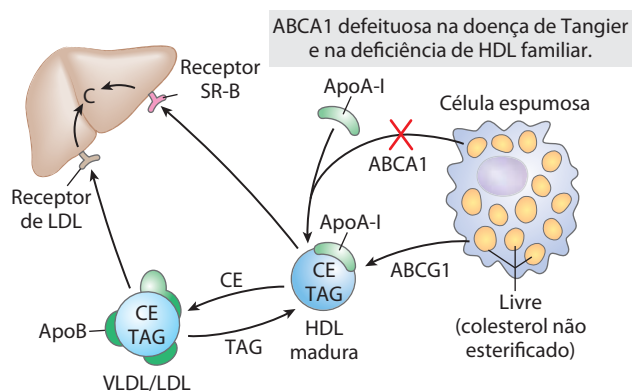



**FIGURA 21-47 O transporte reverso do colesterol.** ApoA-I e HDL captam o excesso de colesterol das células periféricas, com a participação dos transportadores ABCA1 e ABCG1 e retornam para o fígado. Em indivíduos com defeito genético em ABCA1, a falha no transporte reverso de colesterol leva a doenças cardiovasculares severas e precoces: doença de Tangier e doença da deficiência de HDL familiar.

HDL madura, facilitando o movimento de colesterol para fora da célula e para HDL. Esse processo de efluxo é particularmente crítico quando envolve o transporte reverso do colesterol para fora das células espumosas no local das placas que se formam nos vasos sanguíneos de indivíduos com doença cardiovascular.

Na **deficiência de HDL familiar**, os níveis de HDL são muito baixos; e na **doença de Tangier**, eles são quase indetectáveis (Figura 21-47). Essas duas doenças genéticas são o resultado de mutações na proteína ABCA1. A apoA-I na HDL sem colesterol não pode captar colesterol das células carentes da proteína ABCA1, e apoA-I e a HDL pobre em colesterol são rapidamente removidas do sangue e destruídas. Tanto a deficiência de HDL familiar como a doença de Tangier são muito raras (em todo o mundo, menos de 100 famílias com a doença de Tangier são conhecidas), mas a existência dessas doenças estabelece uma função para as proteínas ABCA1 e ABCG1 na regulação dos níveis plasmáticos de HDL. ■

## Os hormônios esteroides são formados por clivagem da cadeia lateral e oxidação do colesterol

Os humanos produzem todos os seus hormônios esteroides a partir do colesterol (**Figura 21-48**). Duas classes de hormônios esteroides são sintetizadas no córtex da glândula suprarrenal: os **mineralocorticoides**, que controlam a reabsorção de íons inorgânicos ($Na^+$, $Cl^-$ e $HCO_3^-$) pelos rins, e os **glicocorticoides**, que auxiliam na regulação da gliconeogênese e reduzem a resposta inflamatória. Os hormônios sexuais são produzidos nas gônadas masculinas e femininas e na placenta. Entre eles estão a **progesterona**, que regula o ciclo reprodutivo feminino, e os **androgênios** (como a testosterona) e os **estrogênios** (como o estradiol), que influenciam no desenvolvimento das características sexuais secundárias em machos e em fêmeas, respectivamente. Os hormônios esteroides são efetivos em concentrações muito baixas, sendo assim sintetizados em quantidades relativamente pequenas. Em comparação com os sais biliares, sua produção consome relativamente pouco colesterol.

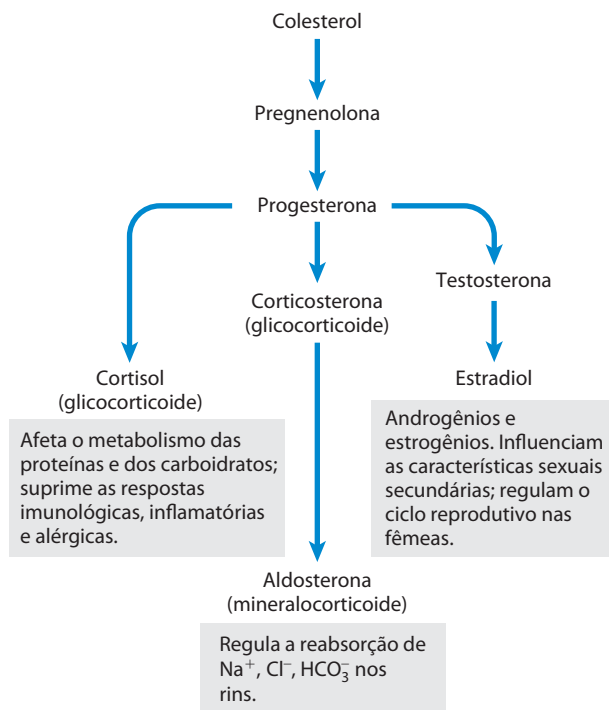
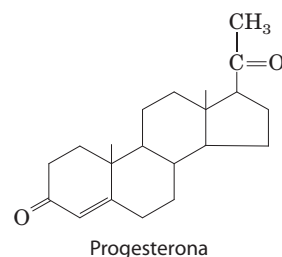



**FIGURA 21-48 Alguns hormônios esteroides derivados do colesterol.** As estruturas de alguns desses compostos são mostradas na Figura 10-19.

$CH_3$ — C=O — O

Progesterona

A síntese dos hormônios esteroides requer a remoção de alguns ou de todos os carbonos na cadeia lateral do C-17 do anel D do colesterol. A remoção da cadeia lateral ocorre na mitocôndria dos tecidos esteroidogênicos. A remoção envolve a hidroxilação de dois carbonos adjacentes na cadeia lateral (C-20 e C-22), seguindo-se a clivagem da ligação entre eles (**Figura 21-49**). A formação dos diversos hormônios também envolve a introdução de átomos de oxigênio. Todas as reações de hidroxilação e oxigenação na biossíntese dos esteroides são catalisadas por oxidases de função mista (Quadro 21-1) que utilizam NADPH, $O_2$ e citocromo P-450 mitocondrial.

## Os intermediários na biossíntese de colesterol têm muitos destinos alternativos

Além de sua função como intermediário na biossíntese de colesterol, o isopentenil-pirofosfato é o precursor ativado de uma ampla gama de biomoléculas com funções biológicas distintas (**Figura 21-50**). Entre elas incluem-se as vitaminas A, E e K; pigmentos vegetais como o caroteno e a cadeia fitol da clorofila; borracha natural; muitos óleos essenciais (como os princípios aromáticos dos óleos de limão,

Colesterol

Oxidase de função mista

$2O_2$ → $2H_2O$

Cit P-450 adrenodoxina (Fe-S)

Adrenodoxina--redutase (flavoproteína)

2 NADPH + $2H^+$ → $2NADP^+$

20,22-Di-hidroxicolesterol

Desmolase

NADPH + $H^+$ + $O_2$ → $NADP^+$ + $H_2O$

Isocaproaldeído

Pregnenolona

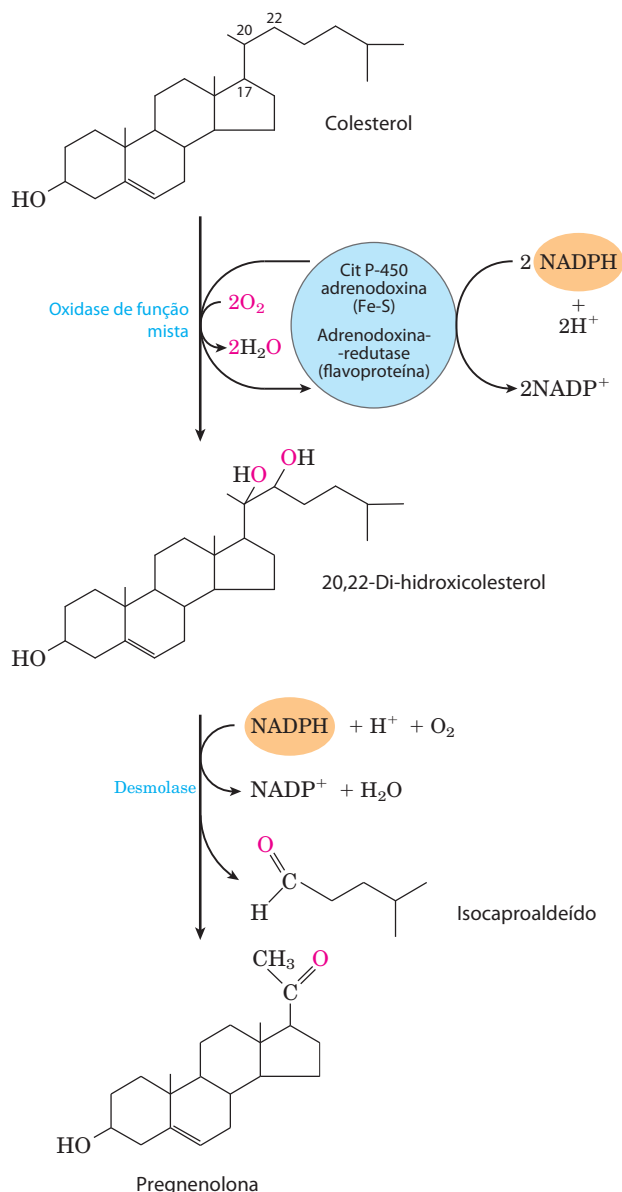



**FIGURA 21-49 Clivagem da cadeia lateral na síntese de hormônios esteroides.** O citocromo P-450 atua como transportador de elétrons neste sistema de oxidases de função mista que oxida átomos de carbono adjacentes. O processo também requer as proteínas transportadoras de elétrons adrenodoxina e adrenodoxina-redutase. Esse sistema de clivagem de cadeias laterais é encontrado na mitocôndria das células do córtex da suprarrenal, ativo na produção de hormônios esteroides. A pregnenolona é o precursor de todos os outros hormônios esteroides (ver Figura 21-48).

eucalipto e almíscar); hormônio juvenil de insetos, que controla a metamorfose; dolicóis, que atuam como transportadores solúveis de lipídeos na síntese de polissacarídeos complexos; e ubiquinona e plastoquinona, transportadores de elétrons na mitocôndria e nos cloroplastos. Coletivamente, essas moléculas são chamadas de isoprenoides. Mais de 20.000 moléculas isoprenoides distintas foram descobertas na natureza, e centenas de novas moléculas desse tipo são descritas a cada ano.

A prenilação (ligação covalente de um isoprenoide; ver Figura 27-35) é um mecanismo comum pelo qual proteínas

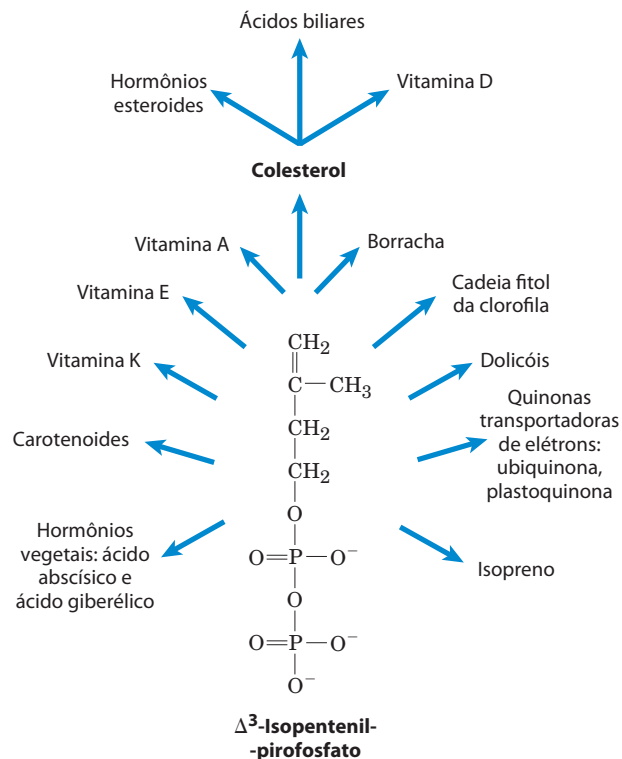



**FIGURA 21-50 Visão geral da biossíntese dos isoprenoides.** As estruturas da maioria dos produtos finais aqui mostrados são fornecidas no Capítulo 10.

são ancoradas à superfície interna de membranas celulares em mamíferos (ver Figura 11-15). Em algumas dessas proteínas, o lipídeo acoplado é o grupo farnesila de 15 carbonos; outras têm o grupo geranil-geranila de 20 carbonos. Enzimas distintas atuam na ligação dos dois tipos de lipídeos. É possível que as reações de prenilação direcionem as proteínas para membranas distintas, dependendo de qual lipídeo está acoplado. A prenilação de proteínas é outra função importante dos derivados do isopreno da via do colesterol.

## RESUMO 21.4 Colesterol, esteroides e isoprenoides: biossíntese, regulação e transporte

- O colesterol é formado a partir de acetil-CoA em uma série complexa de reações, das quais participam os intermediários $\beta$-hidroxi-$\beta$-metilglutaril-CoA, mevalonato e dois isoprenos ativados, dimetilalil-pirofosfato e isopentenil-pirofosfato. A condensação de unidades de isopreno produz o composto acíclico esqualeno, que é ciclizado, gerando o sistema de anéis esteroides e a cadeia lateral.
- O colesterol e os ésteres de colesterila são transportados no sangue como lipoproteínas plasmáticas. A VLDL transporta o colesterol, os ésteres de colesterila e os triacilgliceróis do fígado para os demais tecidos, onde os triacilgliceróis são degradados pela lipase lipoproteica, convertendo VLDL em LDL. A LDL, rica em colesterol e seus ésteres, é captada por endocitose mediada por receptor, em que a apolipoproteína B-100 da LDL é reconhecida pelos receptores na membrana plasmática.

- A síntese e o transporte de colesterol estão sob regulação complexa por hormônios, pelo conteúdo de colesterol celular e pelo nível energético (concentração de AMP). HMG-CoA redutase é regulada alostericamente e por modificação covalente. Além disso, as velocidades de síntese e de degradação são controladas por um complexo de três proteínas: Insig, SCAP e SREBP, que detectam os níveis de colesterol e provocam o aumento da síntese ou da degradação da HMG-CoA-redutase. O número de receptores de LDL por célula também é regulado pelo conteúdo de colesterol.
- Condições alimentares ou defeitos genéticos no metabolismo do colesterol podem levar à aterosclerose e a doenças cardíacas. No transporte reverso do colesterol, HDL remove colesterol dos tecidos periféricos, transportando-o para o fígado. Por reduzir o conteúdo de colesterol das células espumosas, HDL protege contra aterosclerose.
- Os hormônios esteroides (glicocorticoides, mineralocorticoides e hormônios sexuais) são produzidos a partir do colesterol por alteração da cadeia lateral e introdução de átomos de oxigênio no sistema de anéis dos esteroides. Além do colesterol, uma ampla variedade de compostos isoprenoides é derivada do mevalonato por meio de condensações do isopentenil-pirofosfato e do dimetilalil-pirofosfato.
- A prenilação de algumas proteínas as direciona para associações com membranas celulares e é essencial para suas atividades biológicas.

## Termos-chave

*Os termos em negrito estão definidos no glossário.*

malonil-CoA 833
acetil-CoA-carboxilase 833
ácido graxo-sintase 834
proteína transportadora de grupos acila (ACP) 836
acil-CoA graxo-dessaturase 843
**oxidases de função mista** 843
estearoil-ACP-dessaturase (EAD) 843
**oxigenases de função mista** 844
**citocromo P-450** 844
ácidos graxos essenciais 845
**prostaglandina** 845
cicloxigenase (COX) 845
prostaglandina $H_2$-sintase 845
tromboxano-sintase 847
**tromboxano** 847
**leucotrieno** 847
glicerol-3-fosfato-desidrogenase 848
ciclo do triacilglicerol 850
**gliceroneogênese** 850
tiazolidinedionas 852
fosfatidilserina 853
fosfatidilglicerol 853
fosfatidiletanolamina 853
**cardiolipina** 855
fosfatidilcolina 855
**plasmalogênio** 856
fator ativador de plaquetas 856
cerebrosídeo 857
esfingomielina 857
**gangliosídeo** 857
**isopreno** 859
mevalonato 860
$\beta$-hidroxi-$\beta$-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) 860
HMG-CoA-sintase 860
HMG-CoA-redutase 860
esqualeno 861
**ácidos biliares** 864
ésteres de colesterila 864
**apolipoproteínas** 864
**quilomícron** 865
via exógena 866
lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) 866
lipoproteína de densidade baixa (LDL) 867
via endógena 867
receptores de LDL 867
endocitose mediada por receptor 868
lipoproteína de alta densidade (HDL) 869
transporte reverso de colesterol 869
circulação êntero-hepática 869
proteínas de ligação ao elemento regulatório de esterol (SREBP) 870
proteína ativadora da clivagem de SREBP (SCAP) 870
proteína induzida por insulina (Insig) 870
receptor hepático X (RHX) 871
receptor X de retinoides(RXR) 871
aterosclerose 871
célula espumosa 871
**estatina** 873

## Leituras adicionais

*As referências gerais dos Capítulos 10 e 17 também são úteis.*

### Gerais

**Vance, D.E. & Vance, J.E. (eds)** (2008) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes,* 5th ed New Comprehensive Biochemistry, Vol. 31, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.

Excelente revisão da estrutura, da biossíntese e da função de lipídeos.

### Biossíntese de ácidos graxos e eicosanoides

**Chan, D.I. & Vogel, H.J.** (2010) Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein. *Biochem. J*. **430**, 1–19.

Revisão de nível intermediário.

**Maier, T., Jenni, S., & Ban, N.** (2006) Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution. *Science* **311**, 1258–1262.

Os grandes complexos multiproteicos que sintetizam ácidos graxos em fungos apresentam arquiteturas interessantes e muito diferentes comparadas àqueles dos mamíferos.

**Munday, M.R.** (2002) Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 1059–1064.

**Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C.M., Kalhan, S.C., Tilghman, S.M. & Hanson, R.M.** (2003) Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J. Biol. Chem.* **278**, 30,413–30,416.

**Sampath, H. & Ntambi, J.M.** (2011) The role of stearoyl-CoA desaturase in obesity, insulin resistance, and inflammation. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. **1243**, 47–53.

Breve resumo das funções dessa enzima na lipogênese em vários processos fisiológicos.

**Smith, W.L., Urade, Y., & Jakovsson, P.-J.** (2011) Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. *Chem. Rev*. **111**, 5821–5865.

Uma revisão avançada.

**Warner, T.D. & Mitchell, J.A.** (2004) Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J.* **18**, 790–804.

**White, S.W., Zheng, J., Zhang, Y.-M., & Rock, C.O.** (2005) The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 791–831.

### Biossíntese de triacilgliceróis e fosfolipídeos de membrana

**Carman, G.M. & Han, G.-S.** (2011) Regulation of phospholipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem*. **89**, 859–883.

Uma revisão avançada.

**Coleman, R.S. & Mashek, D.G.** (2011) Mammalian triacylglycerol metabolism: synthesis, lipolysis, and signaling. *Chem. Rev*. **111**, 6359–6386.

Uma revisão avançada.

**Dowhan, W.** (1997) Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 199–232.

**Gibellini, F. & Smith, T.K.** (2010) The Kennedy pathway—*de novo* synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life* 62, 414–428

**Kennedy, E.P.** (1962) The metabolism and function of complex lipids. *Harvey Lect.* **57**, 143–171.

Descrição clássica do papel dos nucleotídeos da citidina na síntese de fosfolipídeos.

**Raetz, C.R.H. & Dowhan, W.** (1990) Biosynthesis and function of phospholipids in *Escherichia coli. J. Biol. Chem.* **265**, 1235–1238.

Sucinta revisão da biossíntese de fosfolipídeos e lipopolissacarídeos em bactérias.

**Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T.O., Kohlwein, S.D., Haemmerle, G., Lass, A., & Madeo, R.** (2012) Fat signals—lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab.* **15**, 279–291.

## Biossíntese de colesterol, esteroides e isoprenoides

**Bloch, K.** (1965) The biological synthesis of cholesterol. *Science* **150**, 19–28.

Discurso do autor ao receber o Nobel; descrição clássica da síntese dos esteroides em animais.

**Boutte, Y. & Grebe, M.** (2009) Cellular processes relying on sterol function in plants*. Curr. Opin. Plant Biol*. **12**, 705–713.

Revisão sobre a síntese e a função dos esteróis em plantas.

**Brown, M.S. & Goldstein, J.L** (2009) Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J. Lipid Res*. **50**, S15–S27.

Um resumo histórico curto sobre as funções de SCAP e SREBP na regulação da síntese de colesterol.

**Calandra, S., Tarugi, P., Speedy, H.E., Dean, A.F., Bertolini, S., & Shoulders, C.C.** (2011) Mechanisms and genetic determinants regulating sterol absorption, circulating LDL levels, and sterol elimination: implications for classification and disease risk. *J. Lipid Res*. **52**, 1885–1926.

Uma revisão extensa da função do LDL em doenças humanas.

**Calkin, A.C. & Tontonoz, P.** (2012) Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 213–224.

A função desses receptores nucleares no metabolismo do colesterol e sua integração no metabolismo global.

**Chang, T.Y., Chang, C.C.Y., & Cheng, D.** (1997) Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 613–638.

**Choi, S.H. & Ginsberg, H.N.** (2011) Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab*. **22**, 353–363.

Uma revisão sobre a ação da insulina sobre a síntese de lipoproteínas e na circulação.

**Getz, G.S. & Reardon, C.A.** (2011) ABC transporters and the thickening cholesterol plot. *Curr. Opin. Lipidol.* **22**, 72–73.

**Goldstein, J.L. & Brown, M.S.** (2008) From fatty steak to fatty liver: 33 years of joint publications in the JCI. *J. Clin. Invest.* **118**, 1220–1222.

Uma recapitulação curta e excelente do trabalho seminal sobre o colesterol e doença.

**Goldstein, J.L. & Brown, M.S.** (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**, 425–430.

Descrição da regulação alostérica e covalente das enzimas da via do mevalonato; inclui uma breve discussão da prenilação da Ras e de outras proteínas.

**Hanson, J.R.** (2010) Classics of cholesterol biosynthesis. *Biochem. J*., doi:10.1042/BJ20091543.

Uma revisão do trabalho clássico de Popják e Cornforth sobre a síntese de colesterol.

**Hegele, R.A.** (2012) Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat. Rev. Genet*. **10**, 109–120.

Uma revisão sobre as bases genéticas para as variações dos lipídeos e lipoproteínas plasmáticas.

**Jeon, T.-I. & Osborne, T.F.** (2012) SREBPs: metabolic integrators in physiology and metabolism *Trends Endocrinol. Metab.* **23**, 65–72.

Uma revisão em nível intermediário das funções gerais das SREBP, incluindo a homeostasia do colesterol.

**Leduc, V., Jasmin-Belanger, S., & Poirier, J.** (2010) APOE and cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med*. **16**, 469–477.

**Maxfield, F.R. & Tabas, I.** (2005) Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* **438**, 612–621.

**Maxfield, F.R. & van Meer, G.** (2010) Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. *Curr. Opin. Biol.* **22**, 422–429.

**Miller, W.L. & Auchus, R.J.** (2011) The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Rev.* **32**, 81–151.

Uma revisão extensa e avançada.

**Miziorko, H.M.** (2011) Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys*. **505**, 131–143.

**Nes, D.** (2011) Biosynthesis of cholesterol and other sterols. *Chem. Rev*. **111**, 6423–6451.

**Olson, R.E.** (1998) Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. *J. Nutr.* **128** (2 Suppl.), 439S–443S.

Revisão histórica breve e clara sobre os estudos da função das lipoproteínas.

**Raghow, R., Yellaturu, C., Deng, X., Park, E.A., & Elam, M.B.** (2008) SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab*. 19, 65–73.

**Russell, D.W.** (2003) The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 137–174.

**Steinberg, D.** (2006) An interpretive history of the cholesterol controversy, part V: the discovery of the statins and the end of the controversy. *J. Lipid Res.* **47**, 1339–1351.

Última de uma série de cinco partes detalhando a história da controvérsia lipídica que levou ao desenvolvimento das estatinas.

**Tall, A.R., Yvan-Charvet, L., Terasaka, N., Pagler, T., & Wang, N.** (2008) HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. *Cell Metab*. **7**, 365–375.

Transporte reverso do colesterol: o papel dos transportadores ABC.

**Young, S.G. & Fielding, C.J.** (1999) The ABCs of cholesterol efflux. *Nat. Genet.* **22**, 316–318.

Uma breve revisão de três artigos neste número do periódico que estabelecem mutações em ABC1 como causa da doença de Tangier e da deficiência familiar de HDL.

**Shao, Y., Van Berkel, T.J.C., & Van Eck, M.** (2010) Relative roles of various efflux pathways in net cholesterol efflux from macrophage foam cells in atherosclerotic lesions. *Curr. Opin. Lipidol*. **21**, 441–453.

## Problemas

**1. Destino do carbono na síntese dos ácidos graxos.** Utilizando seu conhecimento sobre a biossíntese de ácidos graxos, dê uma explicação para as seguintes observações experimentais:

(a) A adição de acetil-CoA, uniformemente marcada com $^{14}$C, a uma fração solúvel de fígado gera palmitato uniformemente marcado com o $^{14}$C.

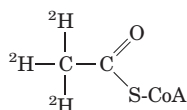
(b) Entretanto, a adição de *traços* de acetil-CoA uniformemente marcada com $^{14}$C na presença de um excesso de malonil-CoA não marcada a uma fração solúvel de fígado gera palmitato marcado com $^{14}$C apenas em C-15 e C-16.

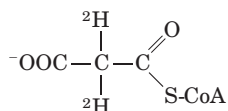
**2. Síntese de ácidos graxos a partir da glicose.** Depois de uma pessoa ter ingerido grande quantidade de sacarose, a glicose e a frutose que excedem as necessidades calóricas são transformadas em ácidos graxos para a síntese de triacilgliceróis. A síntese de ácidos graxos consome acetil-CoA, ATP e NADPH. Como essas substâncias são produzidas a partir de glicose?

**3. Equação global da síntese de ácidos graxos.** Escreva a equação global para a biossíntese de palmitato em fígado de rato, a partir de acetil-CoA mitocondrial e NADPH, ATP e $CO_2$ citosólicos.

**4. Via do hidrogênio na síntese de ácidos graxos.** Considere uma preparação que contenha todas as enzimas e todos os cofatores necessários para a biossíntese de ácidos graxos a partir de acetil-CoA e malonil-CoA.

(a) Se [2-$^2$H]acetil-CoA (marcada com deutério, o isótopo pesado do hidrogênio)

$$^{2}H-\overset{\overset{^{2}H}{|}}{\underset{\underset{^{2}H}{|}}{C}}-C\begin{matrix}\nearrow O\\ \searrow \text{S-CoA}\end{matrix}$$

e um excesso de malonil-CoA não marcada são adicionadas como substratos, quantos átomos de deutério são incorporados em cada molécula de palmitato? Quais são suas localizações? Explique.

(b) Se acetil-CoA não marcada e [2-$^2$H]malonil-CoA

$$^{-}OOC-\overset{\overset{^{2}H}{|}}{\underset{\underset{^{2}H}{|}}{C}}-C\begin{matrix}\nearrow O\\ \searrow \text{S-CoA}\end{matrix}$$

são adicionadas como substratos, quantos átomos de deutério são incorporados em cada molécula de palmitato? Quais são suas localizações? Explique.

**5. Energética da $\beta$-cetoacil-ACP-sintase.** Na reação de condensação catalisada pela $\beta$-cetoacil-ACP-sintase (ver Figura 21-6), uma unidade de quatro carbonos é sintetizada pela combinação de uma unidade de dois carbonos com uma unidade de três carbonos, e com a liberação de $CO_2$. Qual a vantagem termodinâmica desse processo sobre aquele que simplesmente combina duas unidades de dois carbonos?

**6. Modulação da acetil-CoA-carboxilase.** A acetil-CoA--carboxilase é o principal local de regulação na biossíntese dos ácidos graxos. Algumas das propriedades da enzima são descritas abaixo.

(a) A adição de citrato ou isocitrato eleva o $V_{máx}$ da enzima em até 10 vezes.

(b) A enzima existe em duas formas interconversíveis que diferem muito em suas atividades:

$$\text{Protômero (inativo)} \rightleftharpoons \text{polímero filamentoso (ativo)}$$

Citrato e isocitrato ligam-se, preferencialmente, à forma filamentosa e palmitoil-CoA liga-se, preferencialmente, ao protômero.

Explique como essas propriedades são consistentes com o papel regulador da acetil-CoA-carboxilase na biossíntese de ácidos graxos.

**7. Transporte de grupos acetila através da membrana interna da mitocôndria.** O grupo acetila da acetil-CoA, produzido pela descarboxilação oxidativa do piruvato dentro da mitocôndria, é transferido para o citosol pela lançadeira de grupos acetil esquematizada na Figura 21-10.

(a) Escreva a equação global para a transferência de um grupo acetila da mitocôndria para o citosol.

(b) Qual é o custo desse processo em ATP por grupo acetila?

(c) No Capítulo 17, encontramos um transportador de grupo acila na transferência de acil-CoA graxo do citosol para a mitocôndria na preparação para a $\beta$-oxidação (ver Figura 17-6). Um resultado desse transporte é a separação dos conjuntos mitocondrial e citosólico de CoA. A lançadeira de grupos acetila também realiza essa função? Explique.

**8. Necessidade de oxigênio para as dessaturases.** A biossíntese de palmitoleato (ver Figura 21-12), ácido graxo insaturado comum, com uma ligação dupla *cis* na posição $\Delta^9$, utiliza palmitato como precursor. A síntese de palmitoleato pode ser realizada em condições estritamente anaeróbias? Explique.

**9. Custo energético da síntese de triacilgliceróis.** Utilize a equação global para a biossíntese de tripalmitoilglicerol (tripalmitina) a partir de glicerol e palmitato para mostrar quantos ATP são necessários por molécula de tripalmitina formada.

**10. Renovação dos triacilgliceróis no tecido adiposo.** Quando [$^{14}$C]glicose é adicionada à dieta balanceada de ratos adultos, não há aumento na quantidade total de triacilgliceróis estocados, mas os triacilgliceróis tornam-se marcados com $^{14}$C. Explique.

**11. Custo energético da síntese de fosfatidilcolina.** Escreva a sequência de etapas e a reação global para a biossíntese de fosfatidilcolina pela via de salvação a partir de oleato, palmitato, di-hidroxiacetona-fosfato e colina. Iniciando com esses precursores, qual é o custo (em número de ATP) da síntese de fosfatidilcolina pela via de salvação?

**12. Via de salvação para a síntese de fosfatidilcolina.** Um rato jovem mantido em dieta deficiente em metionina não se desenvolve adequadamente a não ser que seja incluída colina na dieta. Explique.

**13. Síntese de isopentenil-pirofosfato.** Se 2[$^{14}$C]acetil--CoA é adicionada a um homogeneizado de fígado de rato que está sintetizando colesterol, onde aparecerá a marcação com $^{14}$C no $\Delta^3$-isopentenil-pirofosfato, a forma ativada de uma unidade isopreno?

**14. Doadores ativados na síntese de lipídeos.** Na biossíntese de lipídeos complexos, os componentes são reunidos pela transferência do grupo apropriado de um doador ativado. Por exemplo, o doador ativado de grupos acetila é a acetil-CoA. Para cada um dos grupos seguintes, forneça a forma do doador ativado: (a) fosfato; (b) D-glicosila; (c) fosfoetanolamina; (d) D-galactosila; (e) acila graxo; (f) metila; (g) o grupo de dois carbonos na biossíntese de ácidos graxos; (h) $\Delta^3$-isopentenila.

**15. Importância das gorduras na dieta.** Quando ratos jovens são alimentados com uma dieta totalmente livre de gordura, eles crescem muito pouco, desenvolvem uma dermatite escamosa, perdem pelo e morrem em pouco tempo – sintomas que podem ser prevenidos se linoleato ou material vegetal é incluído na dieta. O que faz do linoleato um ácido graxo essencial? Por que o material vegetal pode ser utilizado?

**16. Regulação da biossíntese de colesterol.** O colesterol em humanos pode ser obtido a partir da dieta ou sintetizado *de novo*. Um humano adulto com dieta pobre em colesterol sintetiza, geralmente, 600 mg de colesterol por dia no fígado. Se a quantidade de colesterol na dieta é elevada, a síntese *de novo* do colesterol é drasticamente reduzida. Como ocorre essa regulação?

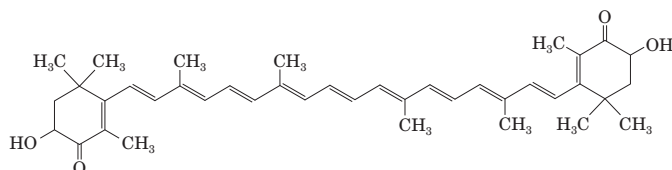
**17. Redução dos níveis de colesterol sérico com estatinas.** Pacientes tratados com um fármaco do tipo estatina geralmente exibem uma redução dramática do colesterol sérico. Entretanto, a quantidade da enzima HMG-CoA-redutase presente nas células pode aumentar substancialmente. Sugira uma explicação para esse efeito.

**18. Funções dos tiol-ésteres na biossíntese de colesterol.** Esquematize um mecanismo para cada uma das três reações mostradas na Figura 21-34, detalhando a via para a síntese de mevalonato a partir de acetil-CoA.

**19. Potenciais efeitos colaterais do tratamento com estatinas.** Embora testes clínicos ainda não tenham sido realizados para documentar os benefícios e os efeitos colaterais, alguns médicos sugerem que pacientes em tratamento com estatinas também utilizem suplemento de coenzima Q. Sugira uma razão para essa recomendação.

## Problema de análise de dados

**20. Engenharia genética em *E. coli* para a produção de grandes quantidades de um isoprenoide.** Uma grande variedade de isoprenoides ocorre naturalmente, alguns deles sendo produzidos industrialmente, tendo importância médica e/ou comercial. Os métodos de produção incluem a síntese enzimática *in vitro,* que é um processo caro e de baixo rendimento. Em 1999, Wang, Oh e Liao publicaram seus experimentos para modificar geneticamente a bactéria de fácil crescimento *E. coli* para produzir grandes quantidades de astaxantina, um isoprenoide importante comercialmente.

A astaxantina é um pigmento carotenoide laranja-avermelhado (um antioxidante) produzido por uma alga marinha. Animais marinhos como camarão, lagosta e alguns peixes que se alimentam de algas têm suas colorações laranja devido à ingestão de astaxantina. A astaxantina é composta por oito unidades isoprenoides; sua fórmula molecular é $C_{40}H_{52}O_4$:

Astaxantina

(a) Circule as oito unidades isoprenoides na molécula de astaxantina. Dica: Use os grupos metila projetados como guia.

A astaxantina é sintetizada pela via mostrada na próxima página, iniciando com $\Delta^3$-isopentenil-pirofosfato (IPP). As etapas ❶ e ❷ estão mostradas na Figura 21-36, e a reação catalisada pela IPP-isomerase é mostrada na Figura 21-35.

(b) Na etapa ❹ da via, duas moléculas de geranil-geranil-pirofosfato são ligadas, formando fitoeno. Esta é uma ligação cabeça com cabeça ou cabeça com cauda? (Mais detalhes na Figura 21-36.)

(c) Descreva brevemente a reação química na etapa ❺.

(d) A síntese de colesterol (Figura 21-37) inclui uma ciclização (fechamento de anel) que envolve a oxidação líquida por $O_2$. A ciclização na etapa ❻ da via sintética da astaxantina requer a oxidação líquida do substrato (licopeno)? Explique seus argumentos.

A *E. coli* não produz grandes quantidades de muitos isoprenoides e não sintetiza astaxantina. Ela é conhecida por sintetizar pequenas quantidades de IPP, DMAPP, geranil-pirofosfato, farnesil-pirofosfato e geranil-geranil-pirofosfato. Wang e colaboradores clonaram vários dos genes de *E. coli* que codificam as enzimas necessárias para a síntese de astaxantina em plasmídeos que permitem sua superexpressão. Esses genes incluem o *idi*, que codifica a IPP-isomerase, e o *ispA*, que codifica uma prenil-transferase que catalisa as etapas ❶ e ❷.

Para modificar geneticamente uma *E. coli*, tornando-a capaz de realizar a via completa da astaxantina, Wang e colaboradores clonaram vários genes de outras bactérias em plasmídeos que permitiriam sua superexpressão em *E. coli*. Esses genes incluíam *crtE* da *Erwinia uredovora*, que codifica uma enzima que catalisa a etapa ❸; e *crtB, crtI, crtY, crtZ* e *crtW* da *Agrobacterium aurantiacum*, que codificam as enzimas das etapas ❹, ❺, ❻, ❼ e ❽, respectivamente.

Os investigadores também clonaram o gene *gps* da *Archaeoglobus fulgidus*, superexpressaram esse gene em *E. coli*, e extraíram o produto gênico. Quando esse extrato foi incubado com [$^{14}$C]IPP e DMAPP ou com geranil-pirofosfato, ou farnesil-pirofosfato, apenas o geranil-geranil-pirofosfato marcado com $^{14}$C foi produzido em todos os casos.

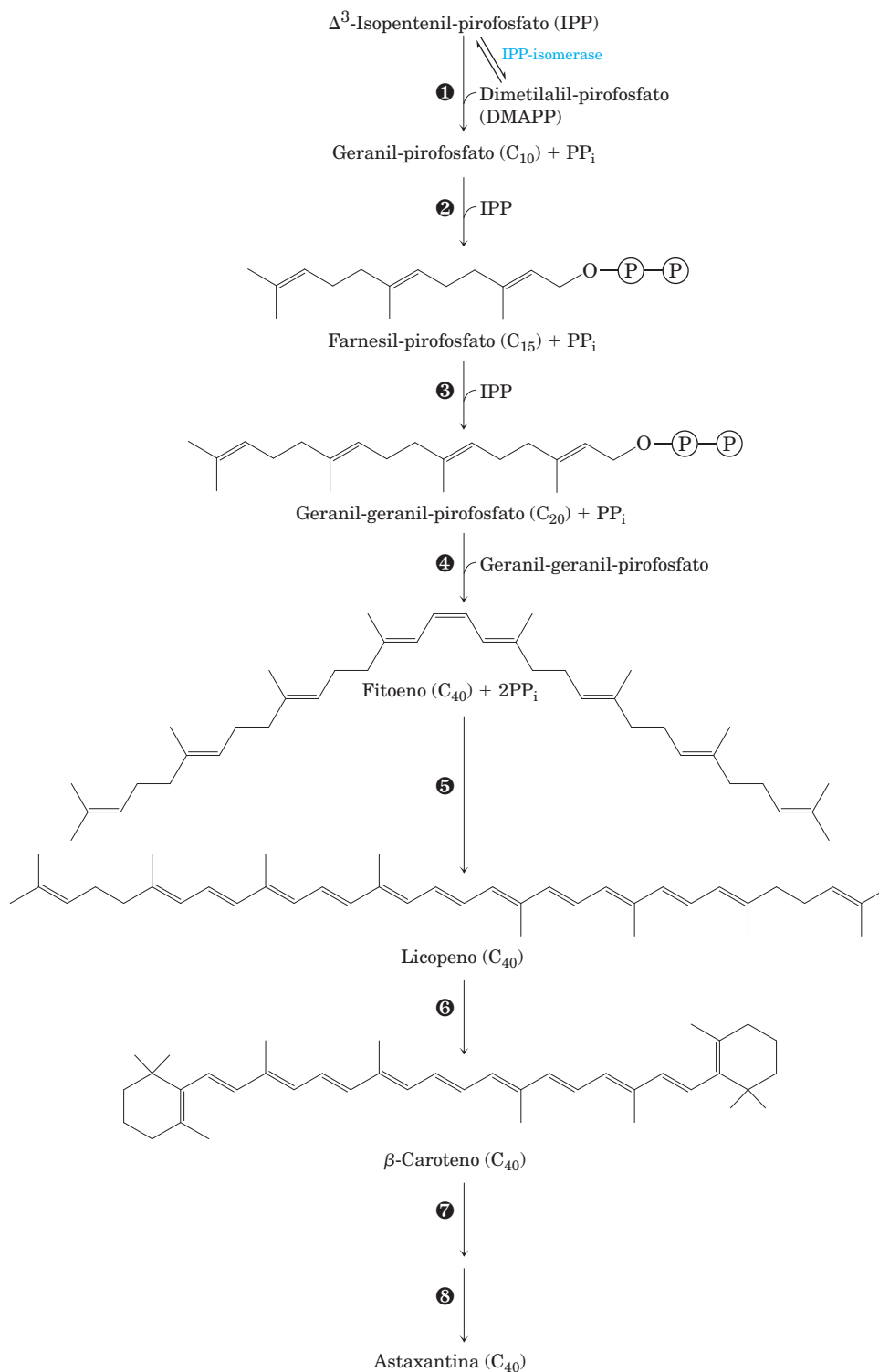
(e) Com base nesses dados, qual(is) etapa(s) da via é(são) catalisada(s) pela enzima codificada pelo *gps*? Explique seu raciocínio.

Wang e colaboradores construíram então diversas linhagens de *E. coli* superexpressando os diferentes genes, e mediram a cor laranja das colônias (colônias de *E. coli* do tipo selvagem são brancas) e a quantidade de astaxantina produzida. Seus resultados estão mostrados a seguir.

| Linhagem | Genes superexpressos | Cor de laranja | Produção de astaxantina ($\mu$g/g de peso seco) |
|---|---|---|---|
| 1 | *crtBIZYW* | – | ND |
| 2 | *crtBIZYW, ispA* | – | ND |
| 3 | *crtBIZYW, idi* | – | ND |
| 4 | *crtBIZYW, idi, ispA* | – | ND |
| 5 | *crtBIZYW, crtE* | + | 32,8 |
| 6 | *crtBIZYW, crtE, ispA* | + | 35,3 |
| 7 | *crtBIZYW, crtE, idi* | ++ | 234,1 |
| 8 | *crtBIZYW, crtE, idi, ispA* | +++ | 390,3 |
| 9 | *crtBIZYW, gps* | + | 35,6 |
| 10 | *crtBIZYW, gps, idi* | +++ | 1.418,8 |

**Nota**: ND = não determinado.

(f) Comparando os resultados para as linhagens de 1 a 4 com aqueles para as linhagens de 5 a 8, o que você pode concluir sobre o nível de expressão de uma enzima capaz de catali-

sar a etapa ❸ da via sintética da astaxantina em *E. coli* do tipo selvagem? Explique seus argumentos.

(g) Com base nos dados, qual enzima é limitante nessa via, a IPP-isomerase ou a enzima codificada pelo *idi*? Explique seu raciocínio.

(h) Você esperaria que uma linhagem superexpressando *crtBIZYW, gps* e *crtE* produza baixos (+), médios (++) ou altos (+++) níveis de astaxantina, medidos por sua cor laranja? Explique seus argumentos.

## Referência

**Wang, C.-W., Oh, M.-K., & Liao, J.C.** (1999) Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli. Biotechnol. Bioeng.* **62**, 235–241.

# 22

# Biossíntese de Aminoácidos, Nucleotídeos e Moléculas Relacionadas



O nitrogênio perde apenas para o carbono, o hidrogênio e o oxigênio em sua contribuição para a massa dos sistemas vivos. A maior parte desse nitrogênio está ligada à estrutura de aminoácidos e nucleotídeos. Neste capítulo, serão abordados todos os aspectos do metabolismo desses compostos nitrogenados, exceto o metabolismo dos aminoácidos, que foi discutido no Capítulo 18.

A discussão conjunta das vias biossintéticas dos aminoácidos e dos nucleotídeos é uma abordagem válida, não apenas porque as duas classes de moléculas contêm nitrogênio (oriundo de fontes biológicas em comum), mas porque os dois conjuntos de vias encontram-se intensamente entrelaçados, com diversos intermediários-chave em comum. Certos aminoácidos ou partes de aminoácidos são incorporados nas estruturas de purinas e pirimidinas e, em um caso, parte de um anel púrico é incorporado em um aminoácido (a histidina). Os dois conjuntos de vias também compartilham muito da química, em especial uma preponderância de reações envolvendo a transferência de nitrogênio ou de grupos de um carbono.

As vias aqui descritas podem ser intimidantes para um estudante iniciando seus estudos de bioquímica. Sua complexidade surge não tanto da própria química, que em muitos casos é bem compreendida, mas do grande número de etapas e da variedade de intermediários. Essas vias serão mais bem compreendidas focalizando-se os princípios metabólicos já discutidos, os intermediários e precursores-chave e as classes comuns de reações. Mesmo um olhar superficial para a química pode ser recompensador, pois nessas vias ocorrem algumas das transformações químicas mais incomuns nos sistemas biológicos; por exemplo, são encontrados exemplos notáveis da rara utilização biológica dos metais molibdênio, selênio e vanádio. Esse esforço também oferece vantagens práticas, especialmente para alunos de medicina humana ou veterinária. Descobriu-se que muitas doenças genéticas de humanos e animais devem-se à ausência de uma ou mais enzimas do metabolismo dos aminoácidos e nucleotídeos, e muitos medicamentos utilizados comumente para combater doenças infecciosas são inibidores de enzimas dessas vias – assim como diversos dos mais importantes agentes da quimioterapia anticâncer.

A regulação é crucial na biossíntese de compostos nitrogenados. Já que cada aminoácido e cada nucleotídeo são necessários em quantidades relativamente pequenas, o fluxo metabólico pela maioria dessas vias é muito menor que o fluxo biossintético de carboidratos e gorduras nos tecidos animais. Uma vez que os diferentes aminoácidos e nucleotídeos devem ser produzidos nas proporções adequadas e no momento certo para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, suas vias biossintéticas devem ser reguladas e coordenadas umas às outras com precisão. Além disso, uma vez que aminoácidos e nucleotídeos são moléculas carregadas, seus níveis devem ser regulados para manter um equilíbrio eletroquímico na célula. Como foi discutido nos capítulos anteriores, as vias metabólicas podem ser controladas por alterações na atividade ou na quantidade de enzimas específicas. As vias abordadas neste capítulo fornecem alguns dos exemplos mais bem compreendidos de regulação da atividade enzimática. O controle das *quantidades* de diferentes enzimas em uma célula (ou seja, de sua síntese e degradação) é um tópico que será estudado no Capítulo 28.

## 22.1 Visão geral do metabolismo do nitrogênio

As vias biossintéticas que levam à produção de aminoácidos e nucleotídeos compartilham uma característica: a necessidade de nitrogênio. Uma vez que compostos nitrogenados solúveis e biologicamente úteis são escassos em ambientes naturais, a maior parte dos organismos mantém uma estrita economia em sua utilização de amônia, aminoácidos e nucleotídeos. De fato, como será visto, aminoácidos, purinas e pirimidinas livres, formados durante a renovação metabólica de proteínas e ácidos nucleicos, frequentemente são utilizados em vias de salvação, isto é, são reutilizados. Inicialmente serão examinadas as vias pelas quais o nitrogênio do ambiente é introduzido nos sistemas biológicos.

## O ciclo do nitrogênio permite a manutenção de um conjunto de nitrogênio biologicamente disponível

A fonte mais importante de nitrogênio é o ar, que apresenta quatro quintos de sua constituição em nitrogênio molecular ($N_2$). Relativamente poucas espécies podem converter o nitrogênio atmosférico em formas úteis para os organismos vivos. Na biosfera, os processos metabólicos de diferentes espécies funcionam de forma interdependente, salvando e reutilizando formas de nitrogênio biologicamente disponíveis em um vasto **ciclo do nitrogênio** (**Figura 22-1**). O primeiro passo no ciclo é a **fixação** (redução) do nitrogênio atmosférico, por bactérias fixadoras de nitrogênio, produzindo amônia ($NH_3$ ou $NH_4^+$). Embora a amônia possa ser utilizada pela maior parte dos organismos vivos, bactérias do solo, que obtêm sua energia pela oxidação da amônia em nitrito ($NO_2^-$) e, por fim, em nitrato ($NO_3^-$), são tão abundantes e ativas que praticamente toda a amônia que chega ao solo é oxidada a nitrato. Esse processo é denominado **nitrificação**. Plantas e muitas bactérias podem captar e reduzir facilmente nitrato e nitrito a amônia, pela ação de nitrato e nitrito-redutases. A amônia assim produzida é incorporada nos aminoácidos pelas plantas. Animais podem utilizar as plantas como fonte de aminoácidos, tanto não essenciais quanto essenciais, para construir suas proteínas. Quando os organismos morrem, a degradação microbiana de suas proteínas retorna a amônia ao solo, onde bactérias nitrificantes novamente a convertem em nitrito e nitrato. Um equilíbrio entre o nitrogênio fixado e o nitrogênio atmosférico é mantido por bactérias que reduzem nitrato a $N_2$ em condições anaeróbias, processo denominado **desnitrificação** (Figura 22-1). Essas bactérias do solo utilizam $NO_3^-$, e não $O_2$, como aceptor final de elétrons, em uma série de reações que, da mesma forma que a fosforilação oxidativa, gera um gradiente de prótons transmembrana, que é utilizado para sintetizar ATP.

O ciclo do nitrogênio pode sofrer uma espécie de "curto-circuito", promovido por um grupo de bactérias, as quais realizam a oxidação anaeróbia da amônia, ou **anamox** (Figura 22-1), processo que converte amônia e nitrito em $N_2$. Entre 50 e 70% da conversão da $NH_3$ em $N_2$ na biosfera pode ocorrer por meio dessa via, que só foi detectada na década de 1980. Os organismos anaeróbios obrigatórios que promovem a anamox são fascinantes por suas características e fornecem algumas soluções úteis relativas aos problemas de tratamento de rejeitos (Quadro 22-1).

Agora serão examinados os processos geradores da amônia que é incorporada em microrganismos, nos vegetais e nos animais que deles se alimentam.

Mais de 90% do $NH_4^+$ gerado por plantas vasculares, algas e microrganismos vem da assimilação do nitrato, em um processo que compreende duas etapas. Inicialmente, o $NO_3^-$ é reduzido a $NO_2^-$ pela **nitrato-redutase**, e então o $NO_2^-$ é reduzido a $NH_4^+$ em uma transferência de seis elétrons, catalisada pela **nitrito-redutase** (**Figura 22-2**). Ambas as reações envolvem cadeias de carreadores de elétrons e cofatores ainda não considerados neste estudo. A nitrato-redutase é uma proteína grande e solúvel ($M_r$ 220.000). Dentro da enzima, um par de elétrons, doados pelo NADH, flui pelos grupos —SH da cisteína, FAD e de um citocromo (cit $b_{557}$), e daí para um novo cofator contendo molibdênio, antes de reduzir o substrato $NO_3^-$ a $NO_2^-$.

A nitrito-redutase das plantas está localizada nos cloroplastos e recebe seus elétrons da ferredoxina (é reduzida em reações dependentes da luz na fotossíntese; ver Seção 19.8). Seis elétrons, doados um por vez pela ferredoxina, passam por um centro 4S-4Fe na enzima e, então, por uma nova molécula do tipo heme (siro-heme) antes de reduzir o $NO_2^-$ a $NH_4^+$ (Figura 22-2). Em microrganismos não fotossintéticos, o NADPH fornece os elétrons para essa reação.

## A fixação do nitrogênio é realizada por enzimas do complexo da nitrogenase

Apenas certas bactérias e arqueias podem fixar o nitrogênio atmosférico. Esses organismos, denominados diazotróficos, incluem as cianobactérias do solo e de águas doces e salgadas, arqueias metanogênicas (anaeróbios estritos que obtêm energia e carbono pela conversão de $H_2$ e $CO_2$ em metano), outros tipos de bactérias do solo de vida livre, como espécies de *Azotobacter,* e bactérias fixadoras de nitrogênio que vivem como **simbiontes** em nódulos de raízes de plantas leguminosas. O primeiro produto importante da fixação do nitrogênio é a amônia, que pode ser utilizada por todos os organismos, seja diretamente ou após conversão em outros compostos solúveis, como nitritos, nitratos ou aminoácidos.

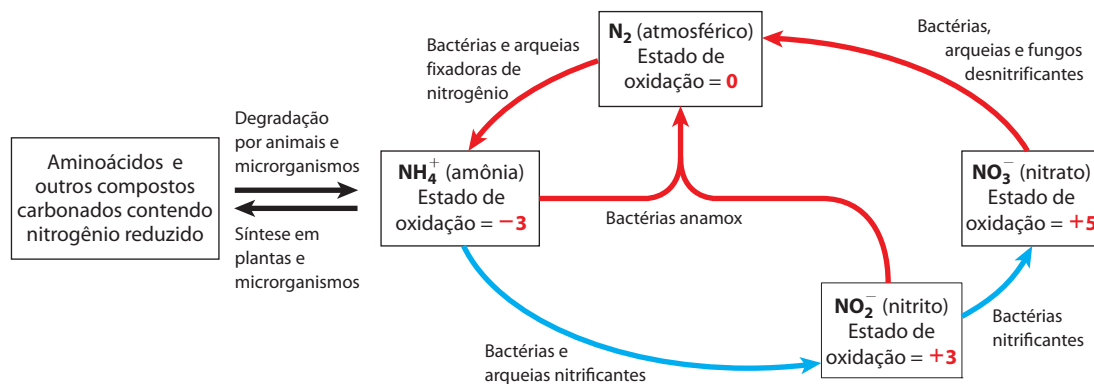



**FIGURA 22-1 O ciclo do nitrogênio.** A quantidade total de nitrogênio fixada anualmente na biosfera excede $10^{11}$ kg. Reações com setas vermelhas ocorrem inteiramente em sua maior parte em ambientes anaeróbios.

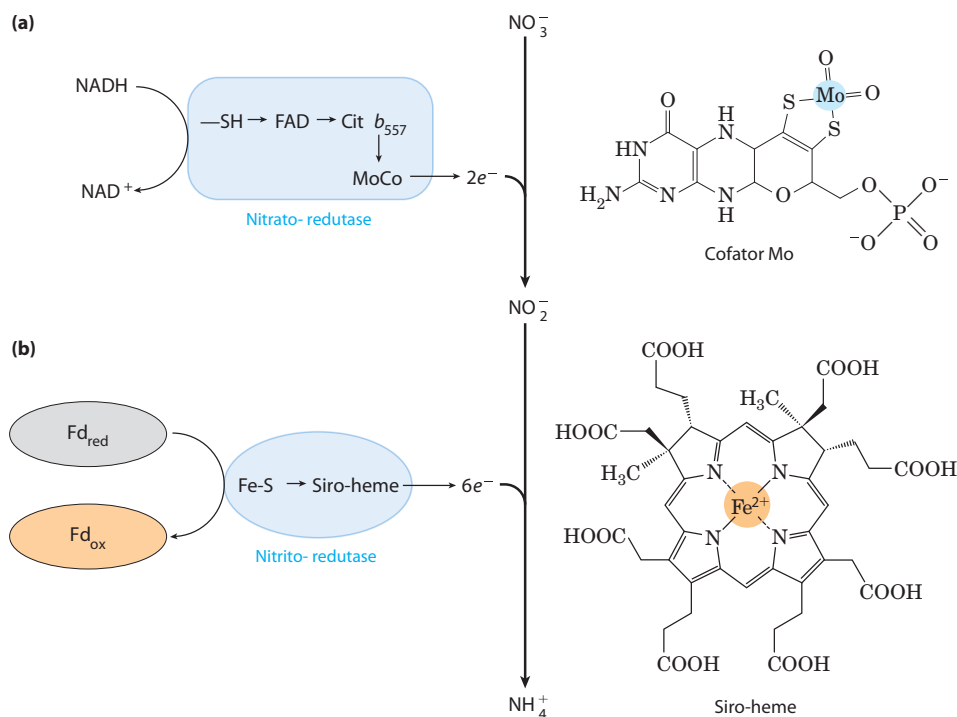
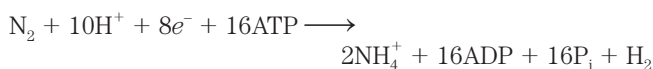



**FIGURA 22-2 Assimilação do nitrato pela nitrato-redutase e pela nitrito--redutase. (a)** A nitrato-redutase de plantas e bactérias catalisa a redução de dois elétrons de $NO_3^-$ a $NO_2^-$, na qual um novo cofator contendo Mo desempenha um papel central. O NADH é o doador de elétrons. **(b)** A nitrito-redutase converte o produto da nitrato-redutase em $NH_4^+$, em um processo de transferência de seis elétrons e oito prótons, em que o centro metálico no siro-heme transporta elétrons e os grupos carboxila do siro-heme podem doar prótons. A fonte inicial de elétrons é a ferredoxina reduzida.

A redução do nitrogênio em amônia é uma reação exergônica:

$$N_2 + 3H_2 \longrightarrow 2NH_3 \qquad \Delta G'^{\circ} = -33{,}5 \text{ kJ/mol}$$

A ligação tripla N≡N, entretanto, é muito estável, com uma energia de ligação de 930 kJ/mol. Assim sendo, a fixação do nitrogênio tem uma energia de ativação extremamente alta, e o nitrogênio atmosférico é quase quimicamente inerte, em condições normais. A amônia é produzida industrialmente pelo processo de Haber (assim chamado em homenagem a seu inventor, Fritz Haber), que requer temperaturas de 400 a 500°C e pressões de nitrogênio e hidrogênio de dezenas de milhares de quilopascais (diversas centenas de atmosferas) para fornecer a energia de ativação necessária. A fixação biológica de nitrogênio, no entanto, deve ocorrer em temperaturas biologicamente adequadas e a 0,8 atmosfera de nitrogênio, e a alta barreira da energia de ativação deve ser contornada utilizando outros meios. Isso é realizado, pelo menos em parte, pela ligação e hidrólise do ATP. A reação global pode ser escrita

$$N_2 + 10H^+ + 8e^- + 16ATP \longrightarrow 2NH_4^+ + 16ADP + 16P_i + H_2$$

A fixação biológica do nitrogênio é realizada por um complexo altamente conservado de proteínas, denominado **complexo da nitrogenase**, cujos componentes centrais são a **dinitrogenase-redutase** e a **dinitrogenase** (**Figura 22-3a**). A dinitrogenase-redutase ($M_r$ 60.000) é um dímero constituído por duas subunidades idênticas, o qual contém um único centro redox 4Fe-4S (ver Figura 19-5) ligado entre as subunidades e que pode ser oxidado e reduzido por um elétron. Essa enzima também tem dois sítios para ligação de ATP/ADP (um sítio em cada subunidade). A dinitrogenase ($M_r$ 240.000), um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$, contém dois cofatores contendo ferro, que transferem elétrons (Figura 22-3b). Um deles, o **grupo P**, contém um par de centros 4Fe-4S que compartilham um átomo de enxofre, constituindo um centro 8Fe-7S. O segundo cofator na dinitrogenase é o **cofator FeMo**, uma estrutura nova, composta por 7 átomos de Fe, 9 átomos de S inorgânico, uma cadeia lateral de Cys e um único átomo de carbono no centro do grupo FeS. Também parte do cofator é um átomo de molibdênio, com ligantes que incluem 3 átomos de S inorgânico, uma cadeia lateral de His e dois átomos de oxigênio de uma molécula de homocitrato, que é parte intrínseca do cofator FeMo. Há também uma forma de nitrogenase que contém vanádio em vez de molibdênio, e algumas espécies de bactérias podem produzir ambos os tipos de sistemas de nitrogenase. A enzima contendo vanádio pode ser o principal sistema de fixação de nitrogênio sob certas condições ambientais. A nitrogenase contendo vanádio do *Azotobacter vinelandii* apresenta a notável capacidade de catalisar a redução do monóxido de carbono (CO) a etileno ($C_2H_4$), etano e propano.

A fixação de nitrogênio é realizada por uma forma de dinitrogenase altamente reduzida e requer oito elétrons: seis para a redução do $N_2$ e dois para a produção de uma molécula de $H_2$. A produção de $H_2$ é parte obrigatória do mecanismo de reação, mas seu papel biológico no processo não é bem compreendido.

A dinitrogenase é reduzida pela transferência de elétrons a partir da dinitrogenase-redutase (**Figura 22-4**). O tetrâmero da dinitrogenase apresenta dois sítios de ligação para a redutase. Os oito elétrons necessários são transferidos, um a um, da redutase para a dinitrogenase: uma molécula de redutase reduzida liga-se à dinitrogenase, transfere um único elétron e então a redutase oxidada se dissocia da dinitrogenase, em um ciclo que se repete. Cada volta do ciclo requer a hidrólise de duas moléculas de ATP pela reduta-

## QUADRO 22-1 Estilos de vida incomuns de seres obscuros, porém abundantes

Como seres que respiram ar, os humanos facilmente deixam de prestar atenção em bactérias e arqueias que proliferam em ambientes anaeróbios. Embora raramente estejam caracterizados em textos introdutórios de bioquímica, esses organismos constituem boa parte da biomassa deste planeta, e suas contribuições ao equilíbrio de carbono e nitrogênio na biosfera são essenciais para todas as formas de vida.

Como detalhado em capítulos anteriores, a energia utilizada para a manutenção dos sistemas vivos depende da geração de gradientes de prótons através de membranas. Os elétrons obtidos de um substrato reduzido são disponibilizados para transportadores de elétrons nas membranas e passam através de uma série de compostos transportadores de elétrons até um aceptor final de elétrons. Como produto colateral desse processo, prótons são liberados para um dos lados da membrana, gerando um gradiente de prótons transmembrana. O gradiente de prótons é utilizado para sintetizar ATP ou para impulsionar outros processos dependentes de energia. Para todos os eucariotos, o substrato reduzido geralmente é um carboidrato (glicose ou piruvato) ou um ácido graxo e o aceptor de elétrons é o oxigênio.

Muitas bactérias e arqueias são bem mais versáteis. Em ambientes anaeróbios, como sedimentos marítimos e de água doce, a variedade de estratégias vitais é extraordinária. Quase qualquer par redox disponível pode ser fonte de energia para algum organismo especializado ou para um grupo de organismos. Por exemplo, um grande número de bactérias litotróficas (litotrófico é um quimiotrófico que utiliza fontes inorgânicas para obter energia; ver Figura 1-5) tem uma hidrogenase que utiliza hidrogênio molecular para reduzir o $NAD^+$:

$$H_2 + NAD^+ \xrightarrow{\text{hidrogenase}} NADH + H^+$$

O NADH é uma fonte de elétrons para vários aceptores de elétrons ligados a membranas, gerando o gradiente de prótons necessário para a síntese de ATP. Outros organismos litotróficos oxidam compostos sulfurosos ($H_2S$, enxofre elementar ou tiossulfato) ou íons ferrosos. Um amplo grupo de arqueias, denominado metanogênios, todos anaeróbios estritos, extrai energia a partir da redução de $CO_2$ a metano. E essa é apenas uma pequena amostra daquilo que organismos anaeróbios fazem para sobreviver. Suas vias metabólicas estão repletas de reações interessantes e de cofatores altamente especializados, desconhecidos em nosso próprio mundo de metabolismo aeróbio obrigatório. O estudo desses organismos pode gerar vantagens práticas e também fornecer pistas sobre as origens da vida em uma Terra primordial, com atmosfera desprovida de oxigênio molecular.

O ciclo do nitrogênio depende de um amplo espectro de bactérias especializadas. Há dois grupos de bactérias nitrificantes: aquelas que oxidam amônia a nitritos e aquelas que oxidam os nitritos resultantes a nitratos (ver Figura 22-1). O nitrato perde apenas para o $O_2$ como aceptor biológico de elétrons, e muitas bactérias e arqueias podem catalisar a desnitrificação de nitratos produzindo nitrogênio, que é novamente convertido em amônia pelas bactérias fixadoras de nitrogênio. A amônia é o principal poluente presente em esgotos e em refugos de animais em fazendas, sendo também um produto derivado do refinamento de óleo e da indústria de fertilizantes. Plantas para o tratamento desses resíduos utilizam comunidades de bactérias nitrificantes e desnitrificantes para converter resíduos contendo amônia em nitrogênio atmosférico. O processo é caro e requer o fornecimento de carbono orgânico e de oxigênio.

Nas décadas de 1960 e 1970, esparsos artigos de pesquisa na literatura sugeriram que a amônia poderia ser oxidada anaerobiamente a nitrogênio, utilizando nitrito como aceptor de elétrons; esse processo foi denominado anamox. Os relatos receberam pouca atenção até bactérias que realizam anamox serem descobertas em um sistema de tratamento de dejetos em Delft, na Holanda, em meados da década de 1980. Uma equipe de microbiólogos holandeses liderada por Gijs Kuenen e Mike Jetten iniciou o estudo dessas bactérias, logo identificadas como pertencentes a um filo bacteriano incomum, os planctomicetos. Algumas surpresas se seguiriam.

A bioquímica subjacente ao processo anamox foi lentamente descoberta (Figura Q-1). A hidrazina ($N_2H_4$), molécula altamente reativa utilizada como combustível em foguetes, surgiu como um intermediário inesperado.

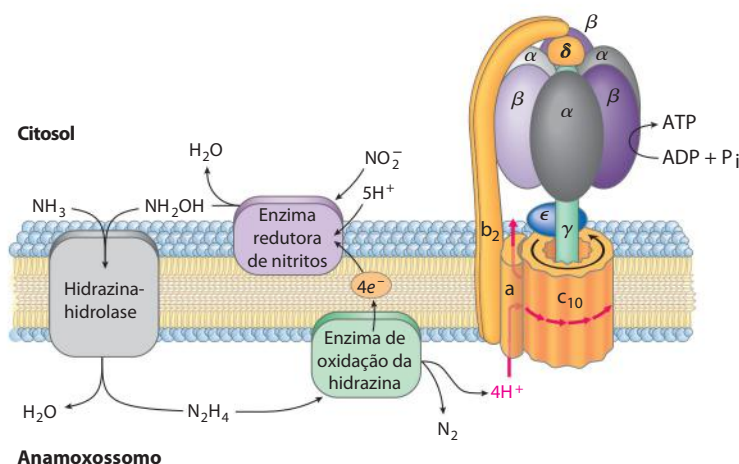



**FIGURA Q-1** As reações anamox. Amônia e hidroxilamina são convertidas em hidrazina e $H_2O$ pela hidrazina-hidrolase, e a hidrazina é oxidada pela enzima de oxidação da hidrazina, produzindo $N_2$ e prótons. Os prótons geram um gradiente de prótons para a síntese de ATP. No exterior do anamoxossomo, os prótons são utilizados pela enzima redutora de nitritos, produzindo hidroxilamina e completando o ciclo. Todas as enzimas do processo anamox estão embebidas na membrana do anamoxossomo.

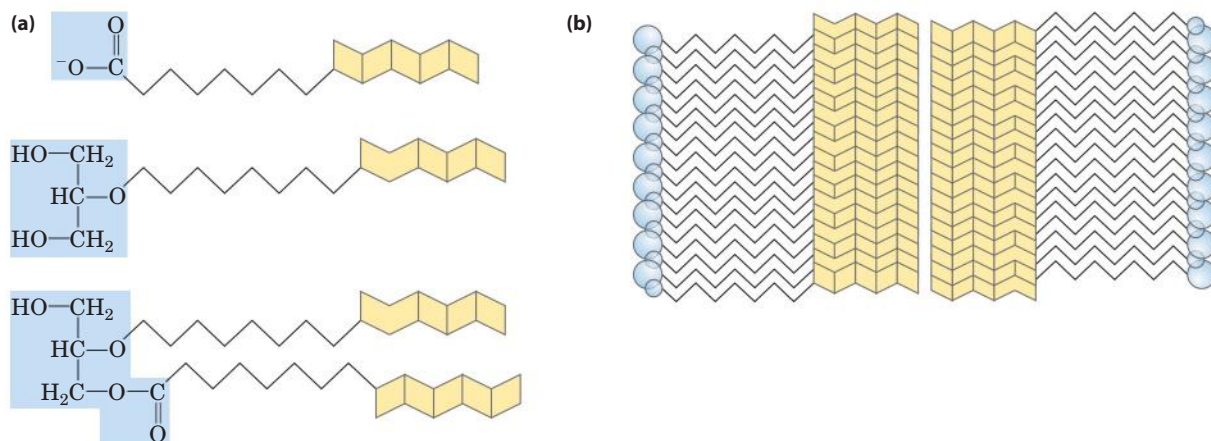



**FIGURA Q-2** **(a)** Lipídeos laderanos da membrana do anamoxossomo. O mecanismo para a síntese das estruturas dos anéis ciclobutanos fundidos, que são instáveis, não é conhecido. **(b)** Laderanos podem empilhar-se, formando uma membrana de estrutura muito densa, impermeável e hidrofóbica, permitindo o sequestro da hidrazina produzida nas reações anamox.

Sendo uma molécula pequena, a hidrazina é ao mesmo tempo altamente tóxica e difícil de conter. Ela se difunde facilmente através de típicas membranas fosfolipídicas. As bactérias anamox resolveram esse problema sequestrando a hidrazina em uma organela especializada, chamada de **anamoxossomo**. A membrana dessa organela é constituída por lipídeos conhecidos como **laderanos** (Figura Q-2), nunca antes encontrados na biologia. Os anéis de ciclobutanos fundidos apresentados pelos laderanos empilham-se de forma compacta, formando uma barreira muito densa e diminuindo muito a liberação de hidrazina. Os anéis de ciclobutano apresentam grande tensão e sua síntese é difícil; os mecanismos bacterianos para a síntese desses lipídeos ainda não são conhecidos.

Os anamoxossomos foram uma descoberta surpreendente. Células bacterianas geralmente não apresentam compartimentos, e a ausência de um núcleo delimitado por membranas costuma ser citada como a principal diferença entre eucariotos e bactérias. A descoberta de um tipo de organela em uma bactéria já foi bastante interessante, mas os planctomicetos também apresentam núcleo: seu DNA cromossômico está contido dentro de uma membrana (Figura Q-3). A descoberta dessa organização subcelular motivou novas pesquisas no sentido de desvendar a origem dos planctomicetos e a evolução do núcleo nos eucariotos. Os planctomicetos representam uma antiga linhagem bacteriana com múltiplos gêneros, três dos quais são conhecidos por desenvolverem reações anamox. Estudos posteriores desse grupo de organismos poderão finalmente nos aproximar de um objetivo extremamente importante da biologia evolutiva: a descrição do organismo afetuosamente chamado de LUCA – o último ancestral comum universal (de *Last Universal Common Ancestor*) de toda a vida em nosso planeta.

Por enquanto, as bactérias anamox fornecem uma grande vantagem para o tratamento de rejeitos, reduzindo o custo da remoção da amônia em até 90% (os passos convencionais de desnitrificação são completamente eliminados e os custos da aeração, associada com a nitrificação, são reduzidos) e diminuindo a liberação de subprodutos poluentes. Claramente, uma maior familiaridade com os alicerces bacterianos da biosfera pode trazer bons resultados, à medida que os desafios ambientais do século XXI são enfrentados.

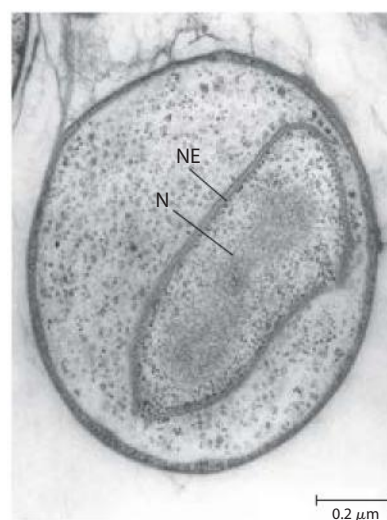



**FIGURA Q-3** Micrografia eletrônica de transmissão de uma secção transversal de *Gemmata obscuriglobus*, mostrando o DNA em um núcleo (N) com envelope nuclear fechado (NE). Bactérias do gênero *Gemmata* (filo Planctomycetes) não realizam reações anamox.

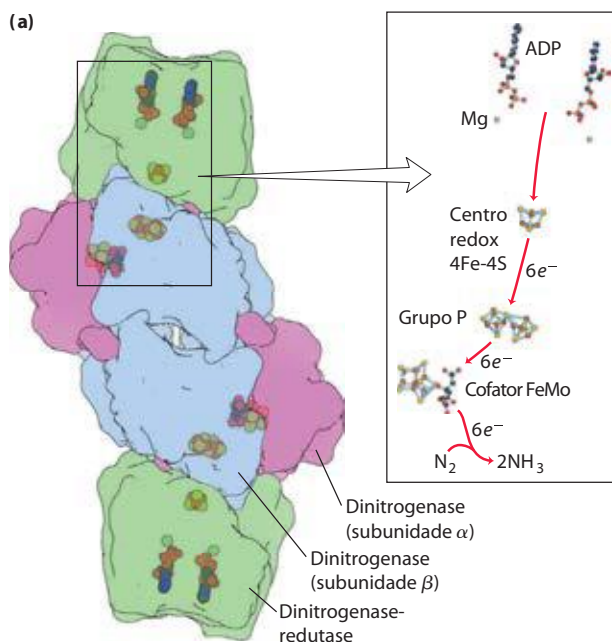
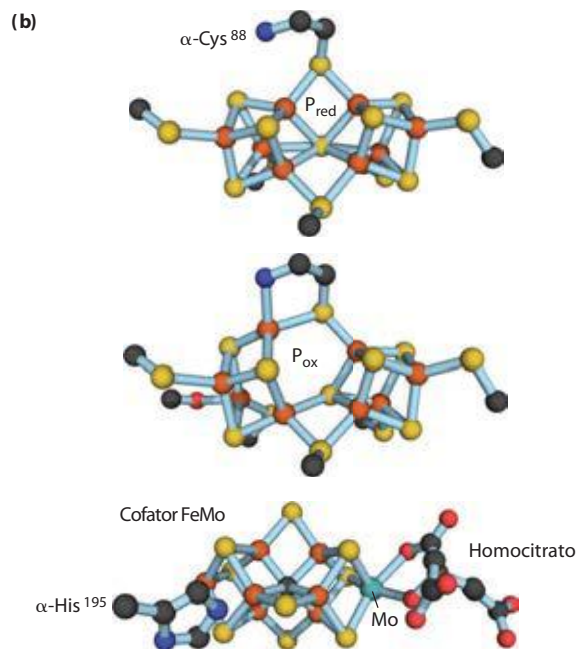
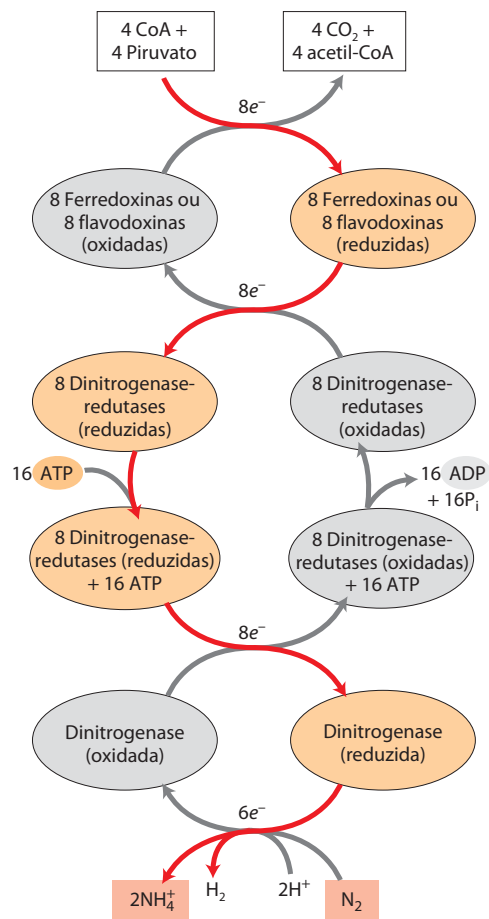



**FIGURA 22-3 Enzimas e cofatores do complexo da nitrogenase.** (PDB ID 1FP6 e PDB 1M1N) **(a)** A holoenzima consiste em duas moléculas idênticas de dinitrogenase-redutase (verde), cada qual com um centro redox 4Fe-4S e sítios de ligação para dois ATP, e dois heterodímeros idênticos de dinitrogenase (roxo e azul), cada qual com um grupo P (centro Fe-S) e um cofator FeMo. Nesta estrutura, o ADP está ligado ao sítio do ATP, para tornar o cristal mais estável. **(b)** Os cofatores para a transferência de elétrons. Um grupo P é mostrado aqui em suas formas reduzida (parte superior) e oxidada (meio). O cofator FeMo (parte inferior) apresenta um átomo de Mo ligado a três S, uma His e dois átomos de oxigênio de uma molécula de homocitrato. Em alguns organismos, o átomo de Mo é substituído por um átomo de vanádio. (O Fe é mostrado em cor de laranja, o S em amarelo.)

se dimérica. A fonte imediata de elétrons para a redução da dinitrogenase-redutase varia, podendo ser a **ferredoxina** reduzida (ver Seção 19.8), a flavodoxina reduzida, e talvez outras fontes que também tenham um papel nessa redução. Em pelo menos uma espécie, a fonte primária de elétrons para reduzir a ferredoxina é o piruvato (Figura 22-4).

O papel do ATP nesse processo é, de certa forma, incomum. Como você deve lembrar, o ATP pode contribuir não apenas com energia química, resultante da hidrólise de uma ou mais de suas ligações fosfoanidrido, mas também com energia de ligação (p. 195), por meio de interações não covalentes, que diminuem a energia de ativação. Na reação catalisada pela dinitrogenase-redutase, tanto a ligação do ATP quanto sua hidrólise determinam alterações conformacionais na proteína que ajudam a superar a alta energia de ativação da fixação do nitrogênio. A ligação de duas moléculas de ATP à redutase desloca o potencial de redução ($E'^{\circ}$) dessa proteína de –300 para –420 mV, e esse aumento de poder redutor é necessário para a transferência de elétrons pela dinitrogenase até o $N_2$; o potencial de redução padrão para a hemirreação $N_2 + 6H^+ + 6e^- \longrightarrow 2\ NH_3$ é –0,34 V. As mo-

**FIGURA 22-4 Fluxo de elétrons na fixação do nitrogênio pelo complexo da nitrogenase.** Os elétrons são transferidos do piruvato para a dinitrogenase via ferredoxina (ou flavodoxina) e dinitrogenase-redutase. A dinitrogenase-redutase reduz a dinitrogenase, que recebe um elétron de cada vez, sendo necessários pelo menos seis elétrons para fixar uma molécula de $N_2$. Dois elétrons adicionais são utilizados para reduzir 2 $H^+$ a $H_2$, em um processo que acompanha obrigatoriamente a fixação de nitrogênio em anaeróbios, perfazendo um total de oito elétrons necessários por molécula de $N_2$. As estruturas das subunidades e os cofatores metálicos das proteínas dinitrogenase-redutase e dinitrogenase estão descritos no texto e na Figura 22-3.

léculas de ATP são então hidrolisadas imediatamente antes da transferência de fato de um elétron para a dinitrogenase.

A ligação e a hidrólise do ATP mudam a conformação da nitrogenase-redutase em duas regiões, as quais são estruturalmente homólogas às regiões comutadoras 1 e 2 de proteínas ligantes de GTP envolvidas na sinalização biológica (ver Quadro 12-2). A ligação do ATP produz uma alteração conformacional que traz o centro 4Fe-4S da redutase para mais próximo ao grupo P da dinitrogenase (de uma distância de 18 Å para 14 Å), o que facilita a transferência de elétrons entre a redutase e a dinitrogenase. Os detalhes da transferência de elétrons do grupo P para o cofator FeMo e os meios pelos quais oito elétrons acumulam-se na nitrogenase não são bem conhecidos, assim como não são completamente conhecidos os intermediários dessa reação; duas hipóteses razoáveis estão sendo testadas, ambas envolvendo o átomo de Mo em um papel central (**Figura 22-5**).

Outra característica importante do complexo da nitrogenase é sua extrema labilidade na presença do oxigênio. A redutase é inativada pelo ar, com meia-vida de 30 segundos; a dinitrogenase apresenta meia-vida de apenas 10 minutos na presença de ar. Bactérias de vida livre que fixam nitrogênio lidam com esse problema de diversas formas. Algumas vivem apenas anaerobiamente ou reprimem a síntese da nitrogenase quando o oxigênio estiver presente. Algumas espécies aeróbias, como o *Azotobacter vinelandii*, desacoplam parcialmente a transferência de elétrons da síntese de ATP, de modo que o oxigênio é gasto tão rapidamente quanto entra na célula (ver Quadro 19-1). Quando fazem fixação de nitrogênio, culturas dessas bactérias induzem um aumento real da temperatura, como resultado de seus esforços para se livrar do oxigênio.

A relação simbiótica entre plantas leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio nos nódulos de suas raízes (**Figura 22-6**) engloba os dois problemas do complexo da nitrogenase: as necessidades de energia e a labilidade frente ao oxigênio. É provável que a energia necessária para a fixação do nitrogênio tenha sido a força que evolutivamente levou a essa associação entre planta e bactéria. As bactérias

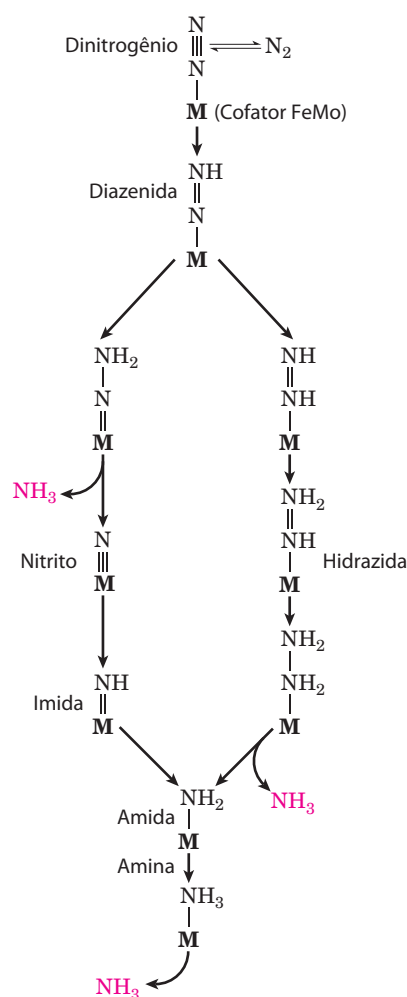
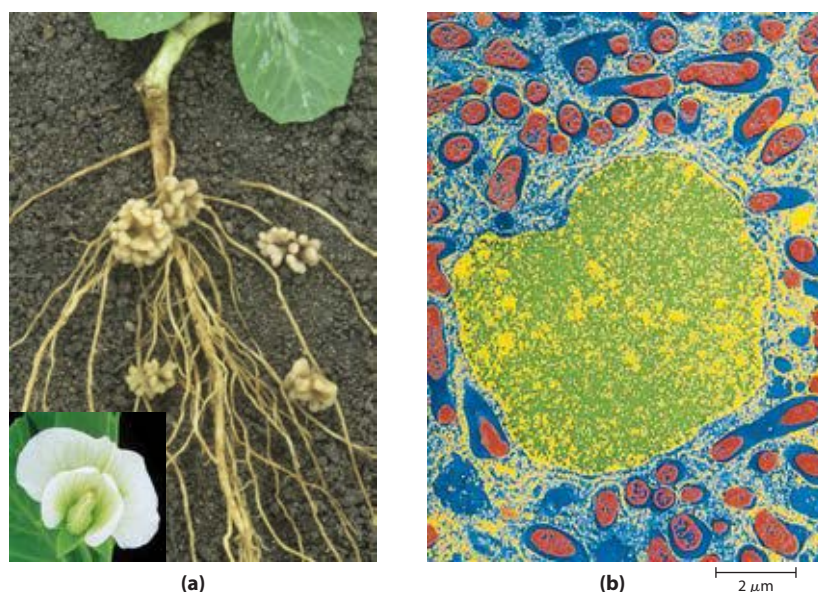



**FIGURA 22-5 Duas hipóteses razoáveis para os intermediários envolvidos na reação do $N_2$.** Em ambos os cenários, o cofator FeMo (aqui abreviado como **M**) desempenha um papel central, ligando-se diretamente a um dos átomos de nitrogênio do $N_2$, e permanecendo ligado durante toda a sequência de etapas reducionais.

**FIGURA 22-6 Nódulos fixadores de nitrogênio. (a)** Nódulos das raízes da ervilha, *Pisum saliva*, uma leguminosa. A flor desta planta comum é mostrada no detalhe. **(b)** Micrografia eletrônica colorida artificialmente de uma fina secção transversal de um nódulo da raiz de ervilhas. Bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas, ou bacteroides (vermelho), vivem dentro da célula do nódulo, cercadas pela membrana peribacteroide (azul). Os bacteroides produzem o complexo da nitrogenase, que converte nitrogênio atmosférico ($N_2$) em amônio ($NH_4^+$); sem os bacteroides, a planta é incapaz de utilizar $N_2$. A célula infectada da raiz fornece alguns fatores essenciais para a fixação de nitrogênio, incluindo a leg-hemoglobina; esta hemeproteína apresenta alta afinidade de ligação ao oxigênio, o qual é um forte inibidor da nitrogenase. (O núcleo celular é mostrado em amarelo/verde. Outras organelas da célula infectada da raiz normalmente encontradas em células vegetais não estão visíveis nesta micrografia.)

nos nódulos das raízes têm acesso a um grande reservatório de energia na forma de abundantes carboidratos e intermediários do ciclo do ácido cítrico, disponibilizados pela planta. Isso pode permitir à bactéria fixar nitrogênio em quantidades centenas de vezes maiores que o fazem suas primas de vida livre, nas condições normalmente encontradas no solo. Para resolver o problema da toxicidade pelo oxigênio, as bactérias nos nódulos das raízes ficam banhadas em uma solução contendo uma hemeproteína ligadora de oxigênio, a **leg-hemoglobina**, produzida pela planta (embora o heme possa ser fornecido pelas bactérias). A leg-hemoglobina liga todo o oxigênio disponível, de modo que ele não pode interferir na fixação do nitrogênio, e libera de maneira eficiente o oxigênio junto ao sistema de transferência de elétrons bacteriano. O benefício para a planta, naturalmente, é um farto suprimento de nitrogênio reduzido. De fato, os simbiontes bacterianos geralmente produzem muito mais $NH_3$ do que o necessário para seu parceiro simbionte; o excesso é liberado para o solo. A eficiência da simbiose entre plantas e bactérias torna-se evidente no enriquecimento do nitrogênio do solo, realizado por plantas leguminosas. Esse enriquecimento da $NH_3$ no solo é a base dos métodos de rotação de culturas, nos quais o cultivo de plantas não leguminosas (como o milho), que extraem do solo o nitrogênio fixado, é alternado a cada poucos anos com o cultivo de leguminosas como alfafa, ervilhas ou trevo.

A fixação do nitrogênio é um processo energeticamente dispendioso: 16 moléculas de ATP e 8 pares de elétrons produzem apenas 2 $NH_3$. Assim sendo, não é de surpreender que o processo seja estritamente regulado de modo que a $NH_3$ é produzida apenas quando necessário. Alta [ADP], um indicador de baixa [ATP], inibe fortemente a nitrogenase. O $NH_4^+$ reprime a expressão de aproximadamente 20 genes da fixação do nitrogênio (*nif*), inibindo efetivamente a via. A alteração covalente da nitrogenase é também utilizada por alguns seres diazotróficos para controlar a fixação do nitrogênio em resposta à disponibilidade de $NH_4^+$ nas cercanias. Por exemplo, a transferência de um grupo ADP-ribosila a partir de um NADH para um resíduo específico de Arg na nitrogenase-redutase inibe a fixação do $N_2$ no *Rhodospirillum*. Essa é a mesma modificação covalente vista no caso da inibição da proteína G pelas toxinas do cólera e pertussis (ver Quadro 12-2).

A fixação do nitrogênio é alvo de intensos estudos devido à sua imensa importância prática. A produção industrial de amônia para utilização em fertilizantes requer um grande e dispendioso fornecimento de energia, e isso tem estimulado esforços no sentido de desenvolver organismos recombinantes ou transgênicos que possam fixar nitrogênio. Em princípio, técnicas de DNA recombinante (Capítulo 9) poderiam ser utilizadas para transferir DNA que codifica enzimas da fixação de nitrogênio para bactérias e plantas não fixadoras de nitrogênio. Contudo, apenas a transferência desses genes não será suficiente. Cerca de 20 genes são essenciais para a atividade da nitrogenase nas bactérias, muitos deles necessários para a síntese, reunião e inserção de cofatores. Há também o problema de proteger a enzima em seu novo ambiente da destruição pelo oxigênio. No conjunto, há enormes desafios na engenharia da produção de novas plantas fixadoras de nitrogênio. O sucesso desses esforços dependerá de se conseguir contornar o problema da toxicidade do oxigênio em qualquer célula que produza a nitrogenase.

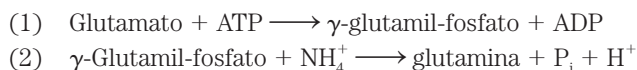
## A amônia é incorporada em biomoléculas via glutamato e glutamina

O nitrogênio reduzido, na forma de $NH_4^+$, é incorporado nos aminoácidos e a seguir em outras biomoléculas nitrogenadas. Dois aminoácidos, **glutamato** e **glutamina**, fornecem um ponto de entrada crítico. Lembre que esses mesmos dois aminoácidos desempenham papéis centrais no catabolismo da amônia e dos grupos amino na oxidação dos aminoácidos (Capítulo 18). O glutamato é fonte de grupos amino para a maior parte dos demais aminoácidos, por meio de reações de transaminação (o reverso da reação mostrada na Figura 18-4). O nitrogênio amídico da glutamina é fonte de grupos amino em uma ampla gama de processos biossintéticos. Na maioria dos tipos celulares e nos fluidos extracelulares dos organismos superiores, um desses aminoácidos ou ambos estão presentes em concentrações mais elevadas – algumas vezes de uma ordem de magnitude ou até mais – que outros aminoácidos. Uma célula de *Escherichia coli* necessita de tanto glutamato que esse aminoácido é um dos principais solutos no citosol. Sua concentração é regulada não apenas em resposta às necessidades de nitrogênio na célula, mas também em função da manutenção de um balanço osmótico entre o citosol e o meio externo.

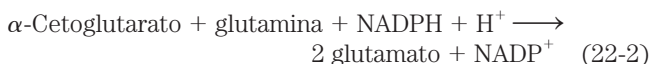
As vias biossintéticas para a produção de glutamato e glutamina são simples, e todos os passos ou alguns deles ocorrem na maioria dos organismos. A via mais importante para a incorporação de $NH_4^+$ em glutamato é constituída por duas reações. Inicialmente, a **glutamina-sintetase** catalisa a reação entre glutamato e $NH_4^+$, produzindo glutamina. Essa reação ocorre em duas etapas, com o $\gamma$-glutamil-fosfato ligado à enzima como intermediário (ver Figura 18-8):

$$\text{(1)}\quad \text{Glutamato} + \text{ATP} \longrightarrow \gamma\text{-glutamil-fosfato} + \text{ADP}$$

$$\text{(2)}\quad \gamma\text{-Glutamil-fosfato} + NH_4^+ \longrightarrow \text{glutamina} + P_i + H^+$$

$$\textit{Soma}\text{: Glutamato} + NH_4^+ + \text{ATP} \longrightarrow \text{glutamina} + \text{ADP} + P_i + H^+ \qquad (22\text{-}1)$$

A glutamina-sintetase é encontrada em todos os organismos. Além de sua importância para a incorporação de $NH_4^+$ em bactérias, esse aminoácido tem um papel central no metabolismo de aminoácidos em mamíferos, convertendo $NH_4^+$ livre, que é tóxico, em glutamina, para transporte pelo sangue (Capítulo 18).

Em bactérias e plantas, o glutamato é produzido a partir da glutamina em uma reação catalisada pela **glutamato-sintase**. (O nome alternativo dessa enzima é glutamato:oxoglutarato-aminotransferase, que origina o acrônimo GOGAT, pelo qual a enzima também é conhecida.) O $\alpha$-cetoglutarato, intermediário do ciclo do ácido cítrico, sofre aminação redutora, com a glutamina como doador de nitrogênio:

$$\alpha\text{-Cetoglutarato} + \text{glutamina} + \text{NADPH} + H^+ \longrightarrow 2\ \text{glutamato} + \text{NADP}^+ \qquad (22\text{-}2)$$

A reação líquida global, considerando a glutamina-sintetase e a glutamato-sintase (Equações 22-1 e 22-2) é

$$\alpha\text{-Cetoglutarato} + NH_4^+ + \text{NADPH} + \text{ATP} \longrightarrow \text{L-glutamato} + \text{NADP}^+ + \text{ADP} + P_i$$

A glutamato-sintase não está presente em animais, os quais, por outro lado, mantêm altos níveis de glutamato por meio

de processos como a transaminação do $\alpha$-cetoglutarato durante o catabolismo dos aminoácidos.

O glutamato também pode ser formado por meio de outra via, embora de menor importância: a reação entre $\alpha$-cetoglutarato e $NH_4^+$, formando glutamato em uma única etapa. Essa reação é catalisada pela L-glutamato-desidrogenase, uma enzima presente em todos os organismos. Os equivalentes redutores são fornecidos pelo NADPH:

$$\alpha\text{-Cetoglutarato} + NH_4^+ + NADPH \longrightarrow \text{L-glutamato} + NADP^+ + H_2O$$

Essa reação já foi estudada no catabolismo dos aminoácidos (ver Figura 18-7). Em células eucarióticas, a L-glutamato-desidrogenase localiza-se na matriz mitocondrial. O equilíbrio da reação favorece os reagentes, e o $K_m$ para o $NH_4^+$ (~1 mM) é tão alto que a reação provavelmente tenha apenas uma contribuição modesta para a captação de $NH_4^+$ em aminoácidos e outros metabólitos. (Lembre que a reação da glutamato-desidrogenase, no sentido inverso [ver Figura 18-10], é uma fonte do $NH_4^+$ destinado ao ciclo da ureia.) Concentrações de $NH_4^+$ suficientemente altas para que a reação da glutamato-desidrogenase tenha uma contribuição significativa para os níveis de glutamato geralmente ocorrem apenas quando $NH_3$ é adicionado ao solo ou quando os organismos crescem em laboratório, na presença de altas concentrações de $NH_3$. Em geral, bactérias do solo e plantas dependem basicamente da via utilizando duas enzimas, descrita anteriormente (Equações 22-1 e 22-2).

## A reação da glutamina-sintetase é um ponto importante de regulação no metabolismo do nitrogênio

A atividade da glutamina-sintetase é regulada em praticamente todos os organismos, o que não é surpreendente, dado seu papel metabólico central como ponto de entrada para o nitrogênio reduzido. Em bactérias entéricas, como a *E. coli*, a regulação é incomumente complexa. A enzima do tipo I (de bactérias) apresenta 12 subunidades idênticas de $M_r$ 50.000 (**Figura 22-7**) e é regulada tanto alostericamente quanto por modificação covalente. (A enzima do tipo II, de eucariotos e de algumas bactérias, tem 10 subunidades idênticas.) A alanina, a glicina e pelo menos seis produtos finais do metabolismo da glutamina são inibidores alostéricos da enzima (**Figura 22-8**). Cada inibidor por si só produz apenas uma inibição parcial, mas os efeitos de múltiplos inibidores são mais que aditivos e todos os oito em conjunto praticamente "desligam" a enzima. Esse é um exemplo de inibição por retroalimentação cumulativa. Esse mecanismo de controle fornece um ajuste constante dos níveis de glutamina, de forma a satisfazer as necessidades metabólicas imediatas da célula.

Sobreposta à regulação alostérica, está a inibição por adenililação (adição de AMP) da $Tyr^{397}$, localizada próxima ao sítio ativo da enzima (**Figura 22-9**). Essa modificação covalente aumenta a sensibilidade aos inibidores alostéricos, e a atividade diminui à medida que mais subunidades vão sendo adenililadas. Tanto a adenililação quanto a desadenililação são realizadas pela **adenilil-transferase** (AT na Figura 22-9), parte de uma cascata enzimática complexa que responde aos níveis de glutamina, $\alpha$-cetoglutarato, ATP e $P_i$. A atividade da adenilil-transferase é modulada pela ligação a uma proteína reguladora denominada $P_{II}$,

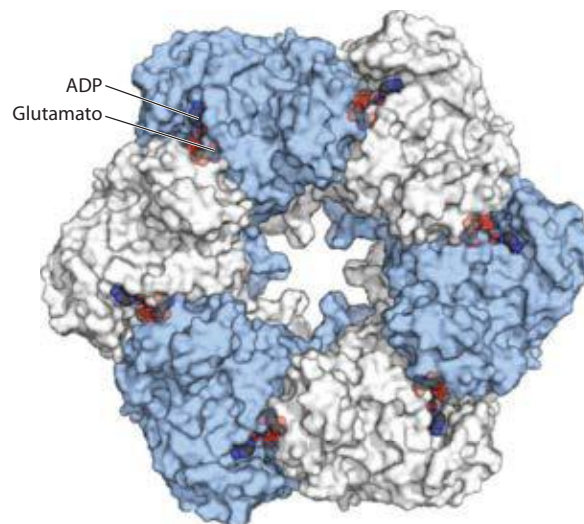



**FIGURA 22-7 Subunidades estruturais da glutamina-sintetase bacteriana do tipo I.** (PDB ID 2GLS) Esta imagem mostra seis das doze subunidades idênticas; uma segunda camada de seis subunidades situa-se diretamente abaixo das seis aqui mostradas. Cada uma das 12 subunidades tem um sítio ativo onde ATP e glutamato são ligados em orientações que favorecem a transferência de um grupo fosforila do ATP para a carboxila da cadeia lateral do glutamato. Nesta estrutura cristalina, o ADP ocupa o lugar do ATP.

e a atividade da $P_{II}$, por sua vez, é regulada por modificação covalente (uridililação), novamente em um resíduo de Tyr. O complexo entre adenilil-transferase e $P_{II}$ uridililada ($P_{II}$-UMP) estimula a desadenililação, enquanto o mesmo complexo, com a $P_{II}$ desuridililada, estimula a adenililação da glutamina-sintetase. Tanto a uridililação quanto a desuridililação da $P_{II}$ são catalisadas por uma única enzima, a **uridilil-transferase**. A uridililação é inibida pela ligação

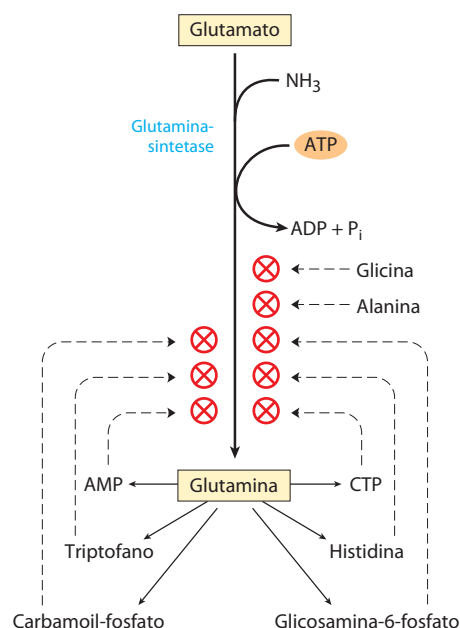



**FIGURA 22-8 Regulação alostérica da glutamina-sintetase.** A enzima está sujeita à regulação cumulativa por seis produtos finais do metabolismo da glutamina. A alanina e a glicina provavelmente atuam como indicadores do estado geral do metabolismo dos aminoácidos na célula.

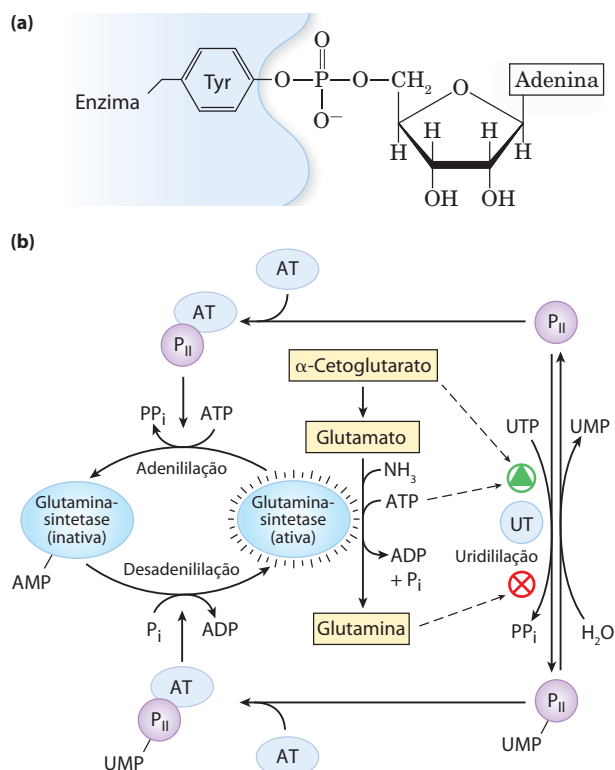



**FIGURA 22-9 Segundo nível de regulação da glutamina-sintetase: modificações covalentes. (a)** Um resíduo de tirosina adenililado. **(b)** Cascata levando à adenililação (inativação) da glutamina-sintetase. AT representa adenililtransferase; UT, uridililtransferase. $P_{II}$ é uma proteína reguladora, ela própria regulada por uridililação. Detalhes dessa cascata são discutidos no texto.

de glutamina e $P_i$ à uridililtransferase e é estimulada pela ligação de $\alpha$-cetoglutarato e ATP à $P_{II}$.

A regulação não cessa nesse ponto. A $P_{II}$ uridililada também controla a ativação da transcrição do gene que codifica a glutamina-sintetase, aumentando a concentração celular da enzima; a $P_{II}$ desuridililada, por sua vez, determina uma diminuição na transcrição do mesmo gene. O mecanismo envolve uma interação da $P_{II}$ com outras proteínas envolvidas na regulação gênica, de um tipo descrito no Capítulo 28. O resultado final desse elaborado sistema de controle é uma diminuição na atividade da glutamina-sintetase quando os níveis de glutamina estão altos e um aumento nessa atividade enzimática quando os níveis de glutamina estão baixos e houver disponibilidade de $\alpha$-cetoglutarato e ATP (substratos da reação da sintetase). Os vários níveis de regulação permitem uma resposta de grande sensibilidade, em que a síntese de glutamina se ajusta às necessidades celulares.

## Diversas classes de reações desempenham papéis especiais na biossíntese de aminoácidos e nucleotídeos

As vias descritas neste capítulo incluem uma série de rearranjos químicos interessantes. Diversos deles são recorrentes e receberão especial atenção antes do estudo das vias em si. Eles incluem (1) reações de transaminação e outros rearranjos promovidos por enzimas contendo piridoxal-fosfato; (2) transferência de grupos de um carbono, utilizando como cofatores tetra-hidrofolato (em geral nos níveis de oxidação —CHO e —$CH_2OH$) ou *S*-adenosilmetionina (no nível de oxidação —$CH_3$); e (3) transferência de grupos amino derivados do nitrogênio amídico da glutamina. Piridoxal-fosfato (PLP), tetra-hidrofolato ($H_4$-folato) e *S*-adenosilmetionina (adoMet) são descritos com detalhes no Capítulo 18 (ver Figuras 18-6, 18-17 e 18-18). Aqui será focalizado o estudo da transferência de grupos amino envolvendo o nitrogênio amídico da glutamina.

Mais de doze reações biossintéticas conhecidas utilizam a glutamina como a principal fonte fisiológica de grupos amino, a maioria delas ocorrendo nas vias descritas neste capítulo. Como classe, as enzimas que catalisam essas reações são denominadas **glutamina-amidotransferases**. Todas elas apresentam dois domínios estruturais: um deles liga a glutamina e o outro liga o segundo substrato, que serve como aceptor do grupo amino (**Figura 22-10**). Acredita-se que um resíduo de Cys conservado no domínio onde ocorre a ligação da glutamina atue como nucleófilo, clivando a ligação amida da glutamina e formando um intermediário glutamil-enzima covalentemente ligado. A $NH_3$ produzida nessa reação não é liberada e sim transferida por meio de um "canal de amônia" a um segundo sítio ativo, onde reage com o segundo substrato, formando um produto aminado. O intermediário covalente é hidrolisado, liberando a enzima livre e o glutamato. Se o segundo substrato necessitar ser ativado, o método usual é a utilização de ATP para gerar um intermediário acil-fosfato (R—OX na Figura 22-10, onde X é o grupo fosforila). A enzima glutaminase atua de modo semelhante, mas utiliza $H_2O$ como o segundo substrato, produzindo $NH_4^+$ e glutamato (ver Figura 18-8).

## RESUMO 22.1 Visão geral do metabolismo do nitrogênio

- O nitrogênio molecular, que constitui 80% do nitrogênio da atmosfera da Terra, encontra-se indisponível para a maior parte dos organismos vivos até que seja reduzido. A fixação do $N_2$ atmosférico ocorre em certas bactérias de vida livre e em bactérias simbióticas nos nódulos das raízes de plantas leguminosas.
- Em bactérias do solo e em plantas vasculares, a ação sequencial da nitrato-redutase e da nitrito-redutase converte o $NO_3^-$ em $NH_3$, que pode ser assimilada em compostos contendo nitrogênio.
- O ciclo do nitrogênio permite a formação de amônia pela fixação bacteriana do $N_2$, a nitrificação da amônia em nitrato por organismos no solo, a conversão do nitrato em amônia por plantas superiores, a síntese de aminoácidos a partir da amônia por todos os organismos e a conversão de nitrato em $N_2$ por bactérias desnitrificantes do solo. As bactérias anamox oxidam anaerobiamente a amônia em nitrogênio, utilizando nitrito como aceptor de elétrons.
- A fixação de $N_2$ como $NH_3$ é realizada pelo complexo da nitrogenase, em uma reação que requer um grande investimento de ATP e de poder redutor. O complexo da nitrogenase é altamente lábil na presença de $O_2$ e está sujeito a regulação pela disponibilidade de $NH_3$.
- Nos sistemas vivos, o nitrogênio reduzido é inicialmente incorporado nos aminoácidos e, a seguir, em uma variedade de outras biomoléculas, incluindo os nucleotídeos. O ponto-chave para essa entrada do nitrogênio é

**MECANISMO – FIGURA 22-10** **Mecanismo proposto para as glutamina--amidotransferases.** Cada enzima apresenta dois domínios. O domínio que tem o sítio de ligação para a glutamina contém elementos estruturais conservados entre muitas destas enzimas, incluindo um resíduo de Cys necessário para a atividade. O domínio de ligação do aceptor de $NH_3$ (segundo substrato) varia. São mostrados dois tipos de aceptores de grupos amino. X representa um grupo ativador, geralmente um grupo fosforila derivado do ATP, que facilita o deslocamento, pela $NH_3$, de um grupo hidroxila do R—OH.

o aminoácido glutamato. O glutamato e a glutamina são doadores de nitrogênio em uma ampla gama de reações biossintéticas. A glutamina-sintetase, que catalisa a formação de glutamina a partir do glutamato, é uma importante enzima reguladora do metabolismo do nitrogênio.

▶ As vias biossintéticas para os aminoácidos e os nucleotídeos utilizam repetidamente os cofatores biológicos piridoxal-fosfato, tetra-hidrofolato e *S*-adenosilmetionina. O piridoxal-fosfato é necessário para reações de transaminação envolvendo o glutamato e para outras transformações dos aminoácidos. Transferências de grupos de um carbono necessitam de *S*-adenosilmetionina e tetra-hidrofolato. Glutamina-amidotransferases catalisam reações que incorporam o nitrogênio derivado da glutamina.

## 22.2 Biossíntese de aminoácidos

Todos os aminoácidos são derivados de intermediários da glicólise, do ciclo do ácido cítrico ou da via das pentoses-fosfato (**Figura 22-11**). O nitrogênio entra nessas vias por meio do glutamato ou da glutamina. Algumas vias são simples, outras não. Dez dos aminoácidos estão a apenas um ou a poucos passos dos metabólitos comuns dos quais são derivados. As vias biossintéticas para outros aminoácidos, como os aminoácidos aromáticos, são mais complexas.

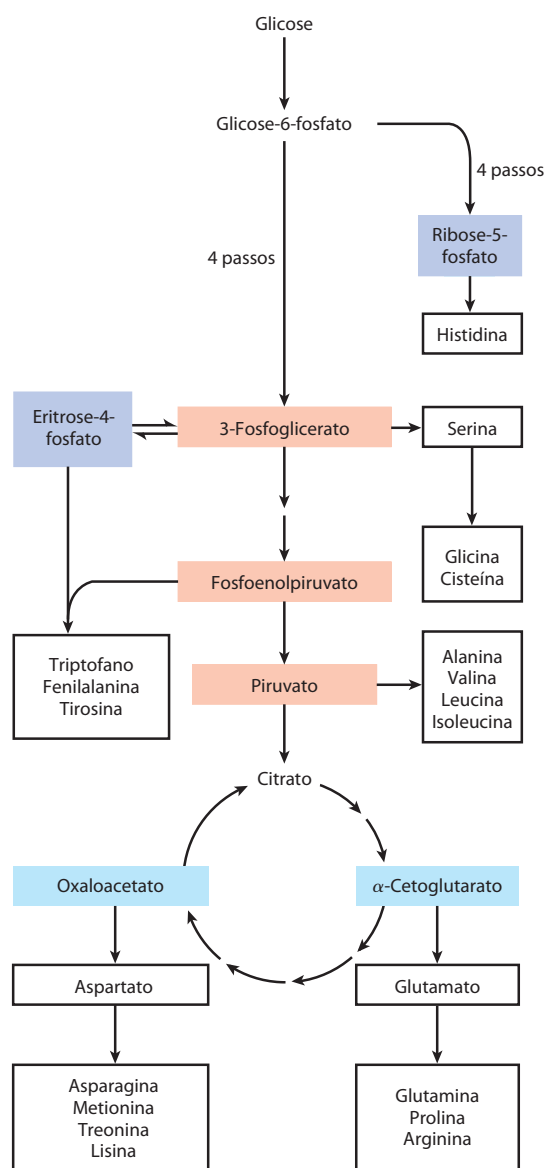
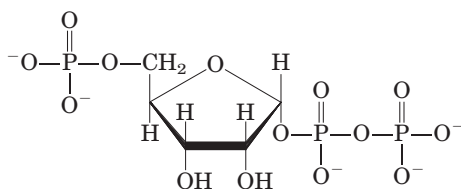



**FIGURA 22-11** **Visão geral da biossíntese de aminoácidos.** Os precursores dos esqueletos de carbono são obtidos a partir de três fontes: a glicólise (cor salmão), o ciclo do ácido cítrico (azul) e a via das pentoses-fosfato (roxo).

Os organismos variam muito em sua capacidade de sintetizar os 20 aminoácidos comuns. Enquanto a maior parte das bactérias e plantas pode sintetizar todos eles, os mamíferos sintetizam apenas cerca de metade deles – geralmente aqueles com vias de síntese mais simples. Esses são os **aminoácidos não essenciais**, não necessários na dieta (ver Tabela 18-1). Os demais, os **aminoácidos essenciais**, devem ser obtidos por meio dos alimentos. A não ser que esteja indicado, as vias para os 20 aminoácidos comuns apresentadas a seguir são aquelas operantes nas bactérias.

Uma forma útil de organizar essas vias biossintéticas é agrupá-las em seis famílias, correspondentes aos seus precursores metabólicos (Tabela 22-1), e essa abordagem será utilizada para estruturar as descrições detalhadas a seguir. Além desses seis precursores, há um intermediário notável em diversas vias de síntese de aminoácidos e nucleotídeos: o **5-fosforribosil-1-pirofosfato** (**PRPP**):

O PRPP é sintetizado a partir da ribose-5-fosfato, obtida da via das pentoses-fosfato (ver Figura 14-22), em reação catalisada pela **ribose-fosfato-pirofosfo-cinase**:

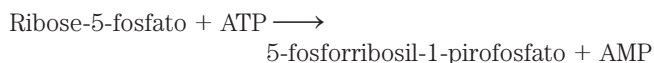
$$\text{Ribose-5-fosfato} + \text{ATP} \longrightarrow \text{5-fosforribosil-1-pirofosfato} + \text{AMP}$$

Essa enzima é regulada alostericamente por muitas das biomoléculas para as quais o PRPP é um precursor.

**TABELA 22-1** Famílias biossintéticas dos aminoácidos, agrupadas de acordo com o precursor metabólico

| Precursor | Aminoácidos |
|---|---|
| **α-Cetoglutarato** | Glutamato, Glutamina, Prolina, Arginina |
| **3-Fosfoglicerato** | Serina, Glicina, Cisteína |
| **Oxaloacetato** | Aspartato, Asparagina, Metionina*, Treonina*, Lisina* |
| **Piruvato** | Alanina, Valina*, Leucina*, Isoleucina* |
| **Fosfoenolpiruvato e eritrose-4-fosfato** | Triptofano*, Fenilalanina*, Tirosina† |
| **Ribose-5-fosfato** | Histidina* |

*Aminoácidos essenciais em mamíferos.
†Derivado da fenilalanina em mamíferos.

## O α-cetoglutarato origina glutamato, glutamina, prolina e arginina

Já foram descritas as biossínteses do **glutamato** e da **glutamina**. A **prolina** é um derivado cíclico do glutamato (**Figura 22-12**). Na primeira etapa da síntese da prolina, o ATP reage com a γ-carboxila do glutamato, formando um acil-fosfato, que é reduzido por NADPH ou NADH, produzindo o γ-semialdeído do glutamato. Esse intermediário sofre uma ciclização rápida e espontânea, sendo novamente reduzido para produzir a prolina.

A **arginina** é sintetizada a partir do glutamato, via ornitina, usando reações do ciclo da ureia nos animais (Capítulo 18). Em princípio, a ornitina também pode ser sintetizada a partir do γ-semialdeído do glutamato por transaminação, mas a ciclização espontânea do semialdeído, gerando prolina, não permite um suprimento suficiente desse intermediário para a síntese de ornitina. As bactérias apresentam uma via biossintética *de novo* para a ornitina (e, portanto, para a arginina), paralela a algumas etapas da via da prolina, mas inclui duas etapas adicionais, que evitam o problema da ciclização espontânea do γ-semialdeído do glutamato (Figura 22-12). Na primeira etapa, o grupo α-amino do glutamato é bloqueado por uma acetilação, para a qual é utilizada a acetil-CoA; depois, após o passo de transaminação, o grupo acetila é removido para produzir ornitina.

As vias para a produção de prolina e arginina são um pouco diferentes nos mamíferos. A prolina pode ser sintetizada pela via mostrada na Figura 22-12, mas também é produzida a partir da arginina obtida da dieta ou de proteínas teciduais. A arginase, enzima do ciclo da ureia, converte arginina em ornitina e ureia (ver Figuras 18-10 e 18-26). A ornitina é convertida no γ-semialdeído do glutamato pela enzima **ornitina-δ-aminotransferase** (**Figura 22-13**). O semialdeído cicliza, produzindo $\Delta^1$-pirrolina-5-carboxilato, o qual é então convertido em prolina (Figura 22-12). A via mostrada na Figura 22-12, para a síntese de arginina, não ocorre em mamíferos. Quando a arginina obtida da dieta ou da renovação de proteínas for insuficiente para a síntese proteica, a reação da ornitina-δ-aminotransferase opera no sentido da formação de ornitina. A ornitina é então convertida em citrulina e arginina, pelo ciclo da ureia.

## Serina, glicina e cisteína são derivadas do 3-fosfoglicerato

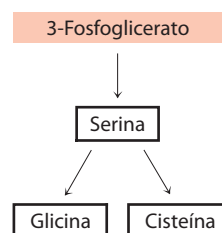
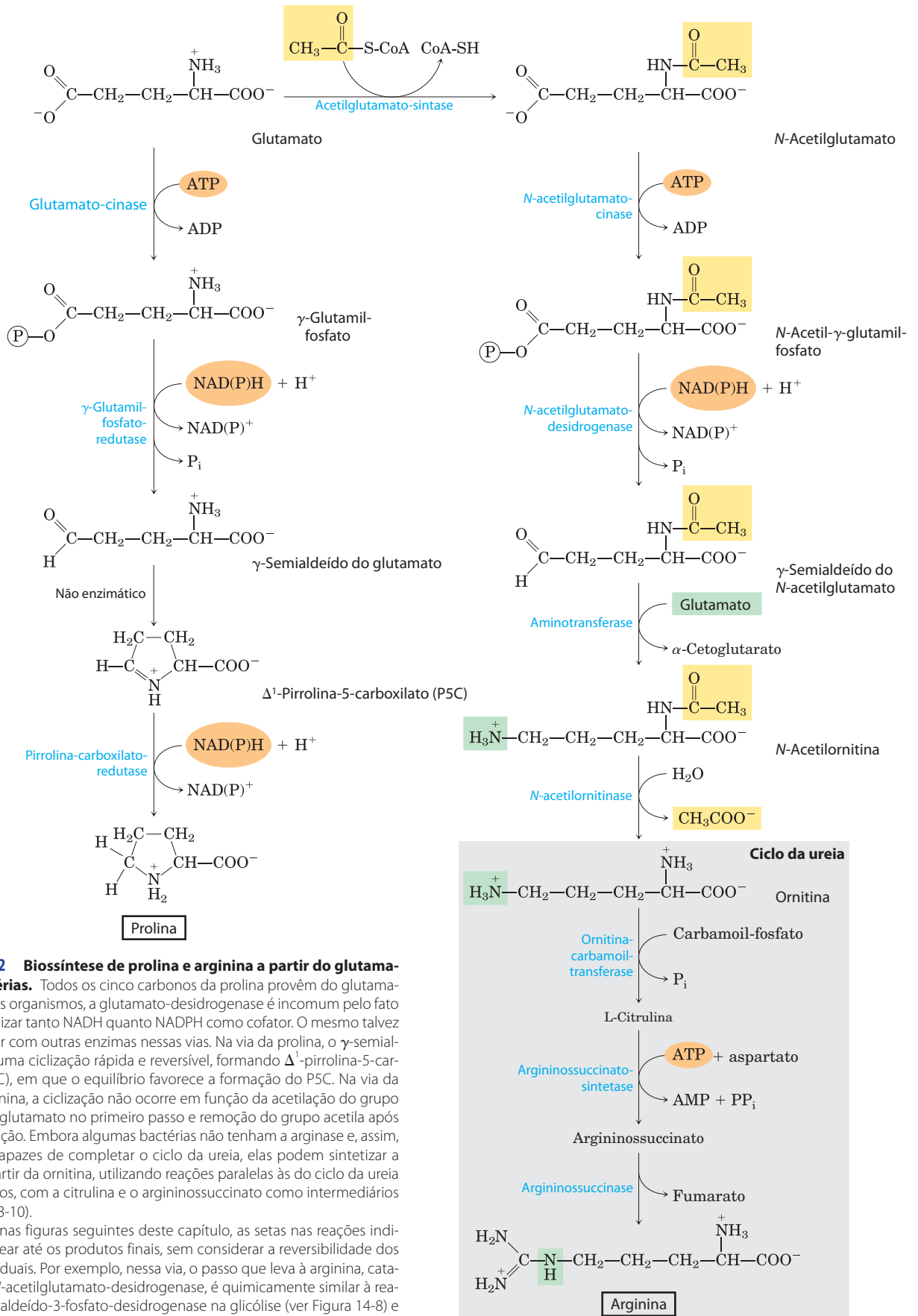
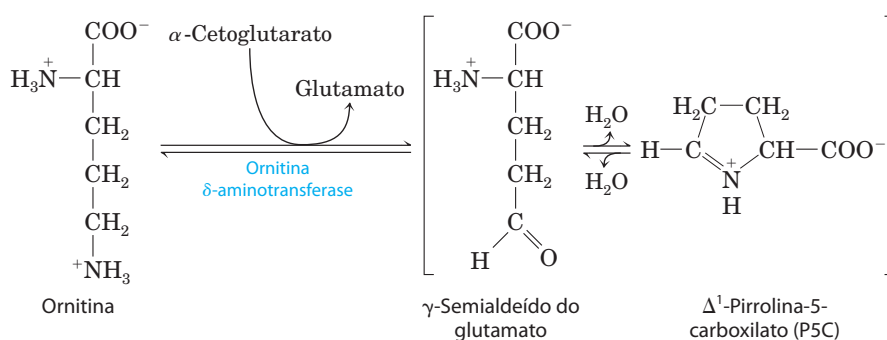
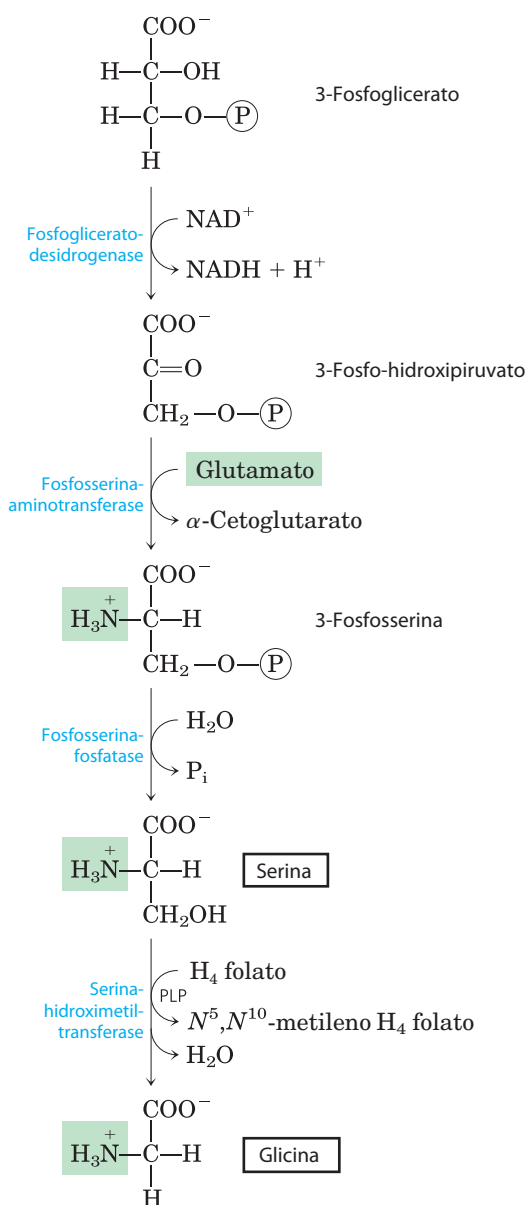



**FIGURA 22-12 Biossíntese de prolina e arginina a partir do glutamato em bactérias.** Todos os cinco carbonos da prolina provêm do glutamato. Em muitos organismos, a glutamato-desidrogenase é incomum pelo fato de poder utilizar tanto NADH quanto NADPH como cofator. O mesmo talvez possa ocorrer com outras enzimas nessas vias. Na via da prolina, o $\gamma$-semialdeído sofre uma ciclização rápida e reversível, formando $\Delta^1$-pirrolina-5-carboxilato (P5C), em que o equilíbrio favorece a formação do P5C. Na via da ornitina/arginina, a ciclização não ocorre em função da acetilação do grupo $\alpha$-amino do glutamato no primeiro passo e remoção do grupo acetila após a transaminação. Embora algumas bactérias não tenham a arginase e, assim, não sejam capazes de completar o ciclo da ureia, elas podem sintetizar a arginina a partir da ornitina, utilizando reações paralelas às do ciclo da ureia nos mamíferos, com a citrulina e o argininossuccinato como intermediários (ver Figura 18-10).

Aqui e nas figuras seguintes deste capítulo, as setas nas reações indicam a via linear até os produtos finais, sem considerar a reversibilidade dos passos individuais. Por exemplo, nessa via, o passo que leva à arginina, catalisado pela *N*-acetilglutamato-desidrogenase, é quimicamente similar à reação da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase na glicólise (ver Figura 14-8) e é facilmente reversível.

**FIGURA 22-13 Reação da ornitina-δ-aminotransferase: um passo na via para a prolina, em mamíferos.** Esta enzima é encontrada na matriz mitocondrial da maioria dos tecidos. Embora o equilíbrio favoreça a formação do P5C, a reação reversa é a única via para a síntese da ornitina (e, portanto, da arginina) em mamíferos quando os níveis de arginina forem insuficientes para a síntese proteica.



A principal via para a produção de **serina** é a mesma em todos os organismos (**Figura 22-14**). No primeiro passo, o grupo hidroxila do 3-fosfoglicerato é oxidado por uma desidrogenase (utilizando $NAD^+$), produzindo 3-fosfo-hidroxipiruvato. Uma transaminação utilizando glutamato produz 3-fosfosserina, que é então hidrolisada em serina livre pela fosfosserina-fosfatase.

A serina (três carbonos) é precursora da **glicina** (dois carbonos), pela remoção de um átomo de carbono pela **serina-hidroximetiltransferase** (Figura 22-14). O tetra-hidrofolato recebe o carbono *β* (C-3) da serina, que forma uma ponte metileno entre N-5 e N-10, originando $N^5$,$N^{10}$-metilenotetra-hidrofolato (ver Figura 18-17). A reação global, que é reversível, também requer piridoxal-fosfato. No fígado de vertebrados, a glicina pode ser produzida por outra via: a reação reversa daquela mostrada na Figura 18-20c, catalisada pela **glicina-sintase** (também denominada **enzima de clivagem da glicina**):

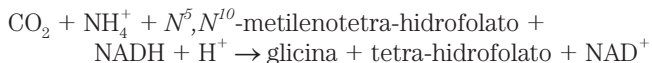
$$CO_2 + NH_4^+ + N^5,N^{10}\text{-metilenotetra-hidrofolato} + NADH + H^+ \rightarrow \text{glicina} + \text{tetra-hidrofolato} + NAD^+$$

Plantas e bactérias produzem o enxofre reduzido necessário para a síntese de **cisteína** (e de metionina, cuja síntese será descrita posteriormente) a partir de sulfatos do ambiente; a via é mostrada no lado direito da **Figura 22-15**. O sulfato é ativado em duas etapas, produzindo 3′-fosfoadenosina-5′-fosfossulfato (PAPS), que sofre redução a sulfeto, usando oito elétrons. O sulfeto é então utilizado para a formação de cisteína a partir de serina, em uma via de dois passos. Os mamíferos sintetizam cisteína a partir de dois aminoácidos: a metionina fornece o átomo de enxofre e a serina fornece o esqueleto carbonado. A metionina é inicialmente convertida em *S*-adenosilmetionina (ver Figura 18-18), que pode perder seu grupo metila para diversos aceptores, formando *S*-adenosil-homocisteína (adoHcy). Esse produto desmetilado é hidrolisado, liberando homocisteína, que reage com a serina em uma reação catalisada pela **cistationina-β-sintase**, produzindo cistationina (**Figura 22-16**). Finalmente, a **cistationina-γ-liase**, enzima que requer PLP, catalisa a remoção de amônia e a clivagem de cistationina, produzindo cisteína livre.



**FIGURA 22-14 Biossíntese de serina a partir de 3-fosfoglicerato e biossíntese de glicina a partir de serina, em todos os organismos.** A glicina também pode ser sintetizada a partir de $CO_2$ e $NH_4^+$ pela ação da glicina-sintase, com $N^5$-$N^{10}$-metilenotetra-hidrofolato como doador do grupo metila (ver texto).

Serina

Serina-acetiltransferase

$H_3C-C(=O)-S\text{-CoA}$ → CoA-SH

*O*-Acetilserina

*O*-acetilserina-(tiol)-liase

$S^{2-} + H^+$ → $CH_3COO^-$

Cisteína

$ATP + SO_4^{2-}$

ATP-sulfurilase

$H^+$ → $PP_i$

Adenina

Adenosina-5′-fosfossulfato (APS)

APS-cinase

ATP → ADP

3′-Fosfoadenosina 5′-fosfossulfato (PAPS)

PAPS-redutase

NADPH → $NADP^+$, 3′-Fosfoadenosina 5′-fosfato (PAP)

$SO_3^{2-}$ Sulfito

Sulfito-redutase

3NADPH → $3NADP^+$

$S^{2-}$ Sulfeto

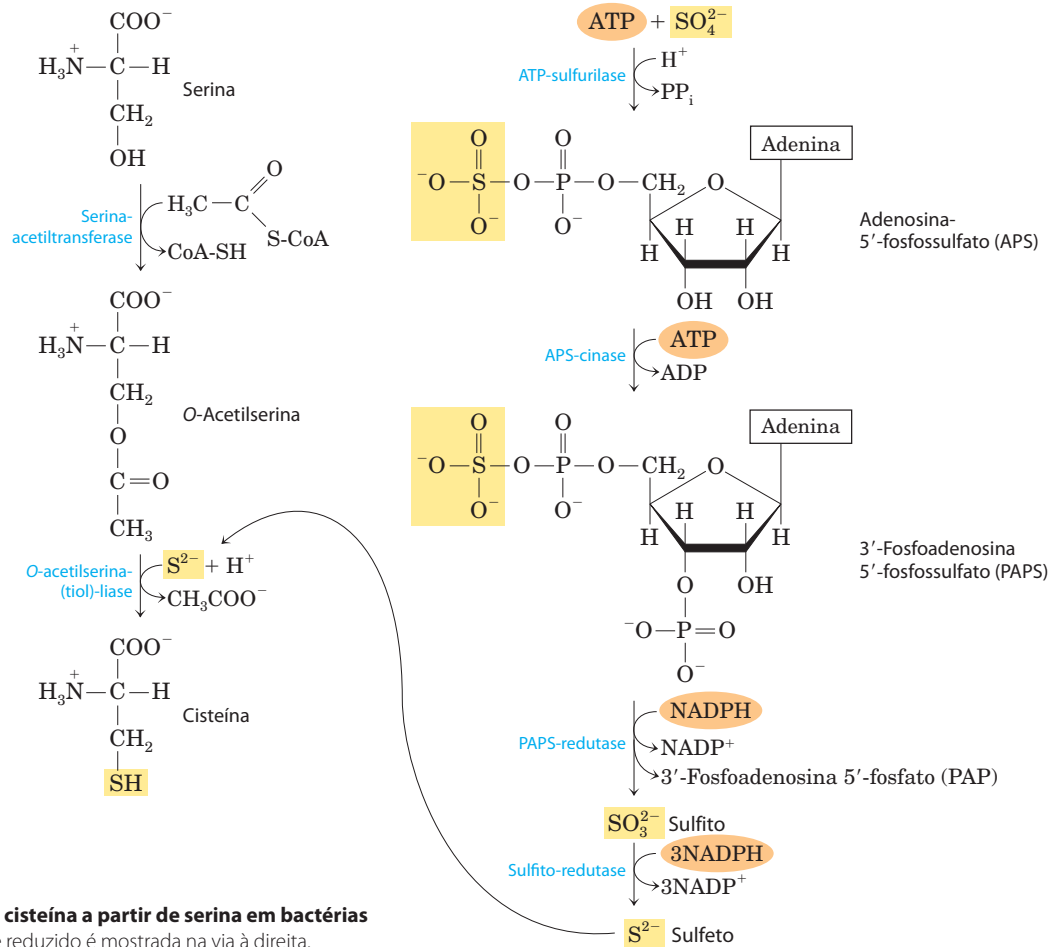



**FIGURA 22-15 Biossíntese de cisteína a partir de serina em bactérias e plantas.** A origem do enxofre reduzido é mostrada na via à direita.

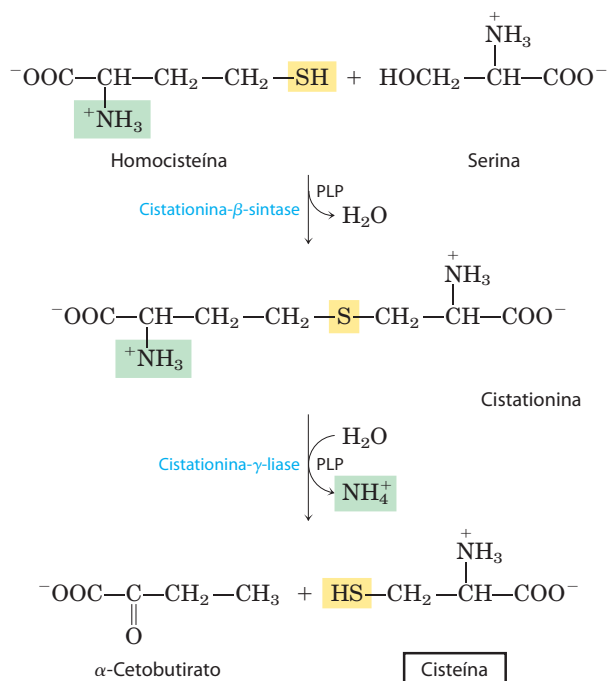
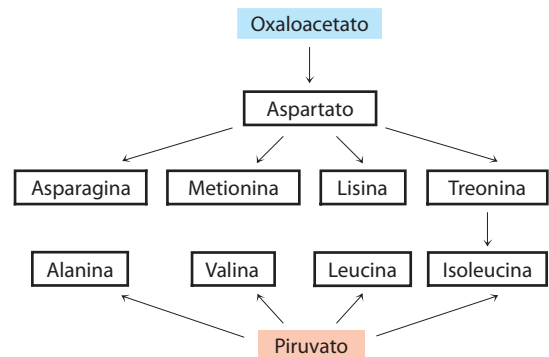



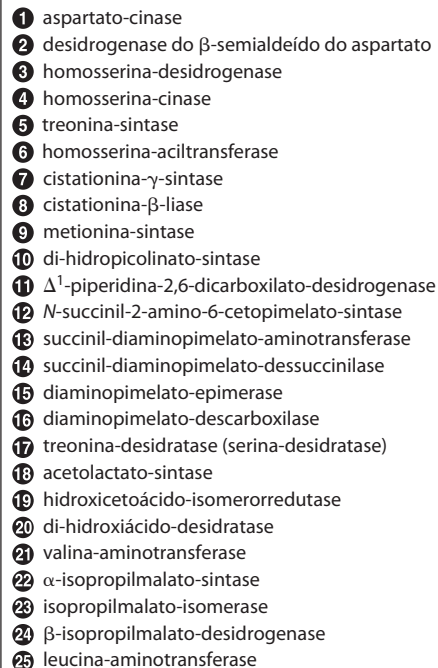
**FIGURA 22-16 Biossíntese de cisteína a partir de homocisteína e serina em mamíferos.** A homocisteína é formada a partir da metionina, como descrito no texto.

## Três aminoácidos não essenciais e seis aminoácidos essenciais são sintetizados a partir de oxaloacetato e piruvato

**Alanina** e **aspartato** são sintetizados a partir de piruvato e oxaloacetato, respectivamente, por transaminação com o glutamato. A **asparagina** é sintetizada por amidação do aspartato, com o $NH_4^+$ sendo doado pela glutamina. Esses são aminoácidos não essenciais e suas vias biossintéticas bastante simples ocorrem em todos os organismos.

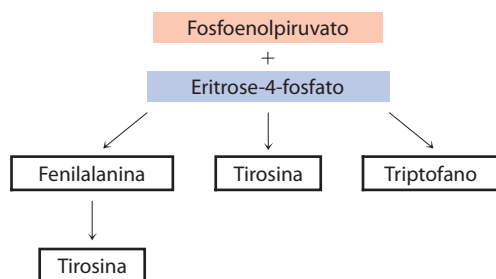
Por razões não compreendidas completamente, linfócitos malignos, presentes na leucemia linfoblástica aguda (LLA) da infância, utilizam asparagina sérica para seu cresci-

**FIGURA 22-17 Biossíntese de seis aminoácidos essenciais a partir de oxaloacetato e piruvato em bactérias: metionina, treonina, lisina, isoleucina, valina e leucina.** Aqui, e em outras vias com múltiplos passos, as enzimas estão listadas na legenda. Observe que o L,L-$\alpha,\varepsilon$-diaminopimelato, o produto do passo ⓮, é simétrico. Os carbonos obtidos a partir do piruvato (e o grupo amino proveniente do glutamato) não são seguidos além deste ponto, pois as reações subsequentes podem colocá-los em qualquer lado da molécula de lisina.

mento. A quimioterapia para essa doença é administrada juntamente com uma L-asparaginase, obtida de bactérias, de modo que a enzima funciona reduzindo a asparagina do soro. Os tratamentos combinados resultam em uma taxa de remissão maior que 95% nos casos de LLA da infância (o tratamento apenas com L-asparaginase produz remissão em 40 a 60% dos casos). No entanto, o tratamento com asparaginase tem alguns efeitos colaterais deletérios, e cerca de 10% dos pacientes que alcançam remissão apresentam recidiva, com tumores resistentes à terapia com fármacos. Pesquisadores es-

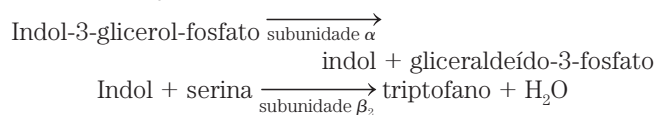
tão desenvolvendo inibidores da asparagina-sintetase humana para acrescentá-los às terapias para a LLA da infância. ■

Metionina, treonina, lisina, isoleucina, valina e leucina são aminoácidos essenciais; humanos não são capazes de sintetizá-los. Suas vias biossintéticas são complexas e interconectadas (**Figura 22-17**). Em alguns casos, as vias em bactérias, fungos e plantas diferem significativamente. A Figura 22-17 mostra as vias em bactérias.

O aspartato origina **metionina**, **treonina** e **lisina**. Os pontos de ramificação dessas vias ocorrem a partir do $\beta$-semialdeído do aspartato, um intermediário em todas as três vias, e a partir da homosserina, um precursor da treonina e da metionina. A treonina, por sua vez, é um dos precursores da isoleucina. As vias da **valina** e da **isoleucina** compartilham quatro enzimas (Figura 22-17, etapas ⓲ a ㉑). O piruvato origina valina e isoleucina por meio de vias que iniciam com a condensação de dois carbonos do piruvato (na forma de hidroxietil-tiamina-pirofosfato; ver Figura 14-15) com outra molécula de piruvato (na via da valina) ou com $\alpha$-cetobutirato (na via da isoleucina). O $\alpha$-cetobutirato é derivado da treonina, em uma reação que requer piridoxal-fosfato (Figura 22-17, etapa ⓱). Um intermediário na via da valina, o $\alpha$-cetoisovalerato, é o ponto de partida para uma ramificação da via, contendo quatro passos, que leva à **leucina** (etapas ㉒ a ㉕).

## O corismato é um intermediário-chave na síntese de triptofano, fenilalanina e tirosina

Anéis aromáticos não estão facilmente disponíveis no ambiente, apesar de o anel benzênico ser muito estável. A via com ramificações levando ao triptofano, à fenilalanina e à tirosina, que ocorre em bactérias, fungos e plantas, é a principal via biológica para a formação do anel aromático. Ela ocorre pelo fechamento do anel a partir de um precursor alifático, seguindo-se a adição, passo a passo, das ligações duplas. Os quatro primeiros passos produzem chiquimato, molécula de sete carbonos derivada da eritrose-4-fosfato e do fosfoenolpiruvato (**Figura 22-18**). O chiquimato é convertido em corismato por meio de três passos, que incluem a adição de mais três carbonos a partir de outra molécula de fosfoenolpiruvato. O corismato é o primeiro ponto de ramificação da via, com uma ramificação levando ao triptofano e outra à fenilalanina e à tirosina.

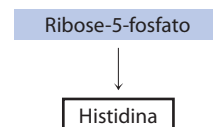
Na ramificação que produz **triptofano** (**Figura 22-19**), o corismato é convertido em antranilato, em uma reação em que a glutamina doa o nitrogênio que se tornará parte do anel indólico. O antranilato então se condensa com o PRPP. O anel indólico do triptofano é derivado dos carbonos do anel e do grupo amino do antranilato, mais dois carbonos oriundos do PRPP. A reação final da sequência é catalisada pela **triptofano-sintase**. Essa enzima apresenta estrutura com quatro subunidades, $\alpha_2\beta_2$, e pode dissociar-se em duas subunidades $\alpha$ e uma unidade $\beta_2$, que catalisam diferentes partes da reação global:

$$\text{Indol-3-glicerol-fosfato} \xrightarrow[\text{subunidade } \alpha]{} \text{indol} + \text{gliceraldeído-3-fosfato}$$

$$\text{Indol} + \text{serina} \xrightarrow[\text{subunidade } \beta_2]{} \text{triptofano} + H_2O$$

A segunda parte da reação requer piridoxal-fosfato (**Figura 22-20**). O indol formado na primeira parte não é liberado pela enzima. Em vez disso, move-se através de um canal, desde o sítio ativo da subunidade $\alpha$ até o sítio ativo de uma das subunidades $\beta$, onde se condensa com uma base de Schiff, um intermediário formado a partir de serina e PLP. Esse tipo de canalização de intermediários pode ser uma característica de toda a via, do corismato ao triptofano. Sítios ativos enzimáticos que catalisam os diferentes passos (algumas vezes não são passos sequenciais) da via até o triptofano são encontrados em polipeptídeos únicos em algumas espécies de fungos e bactérias, mas estão em proteínas separadas em outras espécies. Além disso, a atividade de algumas dessas enzimas requer uma associação não covalente com outras enzimas da via. Essas observações sugerem que todas as enzimas da via são componentes de um grande complexo multienzimático, tanto em bactérias quanto em eucariotos. Tais complexos geralmente não são preservados intactos quando as enzimas são isoladas utilizando métodos bioquímicos tradicionais, mas há grandes evidências da existência de complexos multienzimáticos para essa e outras vias metabólicas (ver Seção 16.3).

Em plantas e bactérias, a **fenilalanina** e a **tirosina** são sintetizadas a partir do corismato, em vias muito menos complexas que a via do triptofano. O intermediário comum é o prefenato (**Figura 22-21**). O passo final em ambos os casos é a transaminação com o glutamato.

Os animais podem produzir tirosina diretamente a partir da fenilalanina, pela hidroxilação no C-4 do grupo fenila pela **fenilalanina-hidroxilase**; essa enzima também participa da degradação da fenilalanina (ver Figuras 18-23 e 18-24). A tirosina é considerada um aminoácido condicionalmente essencial, ou não essencial, na medida em que pode ser sintetizada a partir do aminoácido essencial fenilalanina.

## A biossíntese de histidina utiliza precursores da biossíntese de purinas

A via para a síntese de **histidina** em todas as plantas e bactérias difere em diversos aspectos das vias biossintéticas de outros aminoácidos. A histidina é derivada de três precursores (**Figura 22-22**): o PRPP contribui com cinco carbonos, o anel púrico do ATP contribui com um nitrogênio e um carbono e a glutamina fornece o segundo nitrogênio do anel. Os passos-chave são a condensação do ATP e do PRPP, em que o N-1 do anel púrico liga-se ao C-1 ativado da ribose do PRPP (etapa ❶ na Figura 22-22); a abertura do anel púrico que, ao final, deixa o N-1 e o C-2 da adenina ligados à ribose (etapa ❸); e a formação do anel imidazol, uma reação na qual a glutamina doa um nitrogênio (etapa ❺). A utilização do ATP como metabólito, em vez de um cofator rico em energia, é incomum, porém não resulta em desperdício, pois se encaixa na via biossintética das purinas. A estrutura remanescente da molécula do ATP,

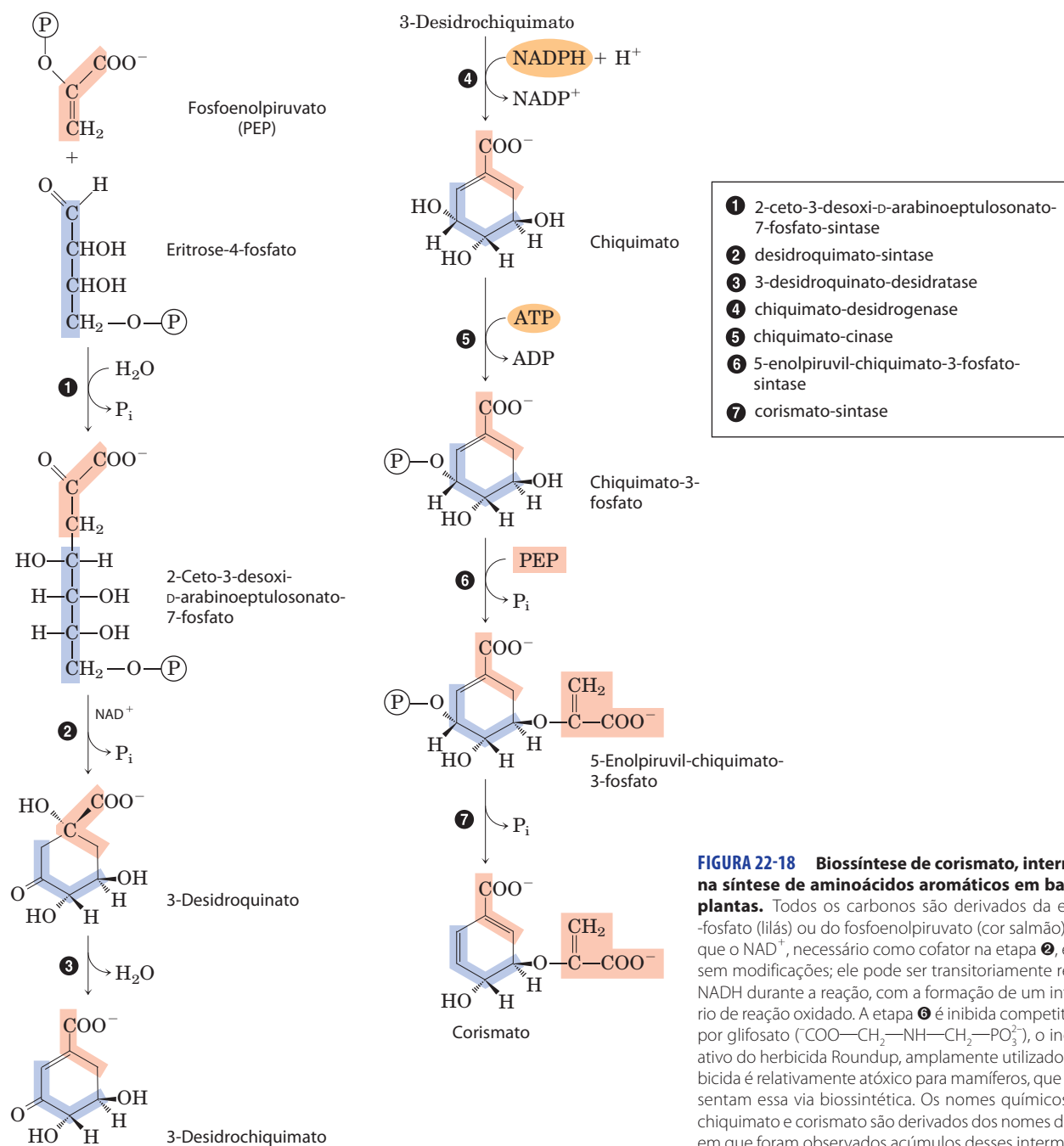



**FIGURA 22-18 Biossíntese de corismato, intermediário na síntese de aminoácidos aromáticos em bactérias e plantas.** Todos os carbonos são derivados da eritrose-4--fosfato (lilás) ou do fosfoenolpiruvato (cor salmão). Observe que o $NAD^+$, necessário como cofator na etapa ❷, é liberado sem modificações; ele pode ser transitoriamente reduzido a NADH durante a reação, com a formação de um intermediário de reação oxidado. A etapa ❻ é inibida competitivamente por glifosato ($^-COO—CH_2—NH—CH_2—PO_3^{2-}$), o ingrediente ativo do herbicida Roundup, amplamente utilizado. Esse herbicida é relativamente atóxico para mamíferos, que não apresentam essa via biossintética. Os nomes químicos quinato, chiquimato e corismato são derivados dos nomes das plantas em que foram observados acúmulos desses intermediários.

liberada após a transferência do N-1 e do C-2, é o 5-aminoimidazol-4-carboxamida-ribonucleotídeo (AICAR), intermediário da biossíntese de purinas (ver Figura 22-35), que é rapidamente reciclado até ATP.

## A biossíntese de aminoácidos está sob regulação alostérica

Como foi detalhado no Capítulo 15, o controle do fluxo por uma via metabólica frequentemente reflete as atividades de múltiplas enzimas daquela via. No caso da síntese de aminoácidos, a regulação ocorre em parte por meio de inibição por retroalimentação da primeira reação, pelo produto final da via. Em geral, essa primeira reação é catalisada por uma enzima alostérica, que desempenha um papel importante no controle geral do fluxo através da via em questão. Como exemplo, a **Figura 22-23** mostra a regulação alostérica da síntese de isoleucina a partir de treonina (detalhada na Figura 22-17). O produto final, a isoleucina, é um inibidor alostérico da primeira reação da sequência. Em bactérias, tal modulação alostérica da síntese dos aminoácidos contribui para o ajuste, minuto a minuto, da atividade da via às necessidades da célula.

A regulação alostérica de uma enzima individual pode ser consideravelmente mais complexa. Um exemplo é o notável conjunto de controles alostéricos exercidos sobre a

glutamina-sintetase de *E. coli* (Figura 22-8). Seis produtos derivados da glutamina atuam como moduladores na retroalimentação negativa da enzima, e os efeitos gerais desses e de outros moduladores são mais que aditivos. Tal regulação é denominada **inibição orquestrada**.

Mecanismos adicionais contribuem para a regulação das vias biossintéticas dos aminoácidos. Uma vez que os 20 aminoácidos comuns devem ser produzidos nas proporções adequadas para a síntese proteica, as células desenvolveram formas não apenas de controlar as velocidades de síntese de aminoácidos individuais, mas também de produzi-los de modo coordenado. Tal coordenação é especialmente bem desenvolvida em células bacterianas de crescimento rápido. A **Figura 22-24** mostra como as células de *E. coli* coordenam a síntese de lisina, metionina, treonina e isoleucina, aminoácidos esses produzidos todos a partir do aspartato. Diversos tipos importantes de padrões inibidores são evidenciados. A etapa desde o aspartato até aspartil-$\beta$-fosfato é catalisada por três isoenzimas, cada uma delas controlada independentemente por diferentes moduladores. Essa **multiplicidade enzimática** impede que um produto final da biossíntese inative completamente etapas-chave em uma via, quando outros produtos da mesma via são necessários. Os passos desde o $\beta$-semialdeído do aspartato até a homosserina e da treonina até o $\alpha$-cetobutirato (detalhados na Figura 22-17) também são catalisados por isoenzimas duplas, independentemente controladas. Uma isoenzima para a conversão de aspartato em aspartil-$\beta$-fosfato é inibida alostericamente por dois moduladores diferentes, lisina e isoleucina, cujas ações são mais que aditivas – outro exemplo de inibição concertada. A sequência desde o aspartato até a isoleucina está sujeita a inibições por retroalimentação múltiplas e sobrepostas; por exemplo, a isoleucina inibe a conversão de treonina em $\alpha$-cetobutirato (como descrito anteriormente), e a treonina inibe sua própria formação em três pontos: a partir da homosserina, a partir do $\beta$-semialdeído do aspartato e a partir do aspartato (etapas ❹, ❸ e ❶ na Figura 22-17). Esse mecanismo regulador global é denominado **inibição sequencial por retroalimentação**.

Padrões semelhantes são evidenciados nas vias que levam aos aminoácidos aromáticos. O primeiro passo da via inicial até a formação do intermediário comum corismato é catalisado pela enzima 2-ceto-3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHP)-sintase (etapa ❶ na Figura 22-18). Muitos dos microrganismos e plantas têm três isoenzimas para a DAHP-sintase. Uma é inibida alostericamente (inibição por retroalimentação) por fenilalanina, outra por tirosina e a terceira pelo triptofano. Esse esquema ajuda a via geral a responder às necessidades celulares para um ou mais dos aminoácidos aromáticos. Regulação adicional ocorre após a via ramificar-se, no corismato. Por exemplo,

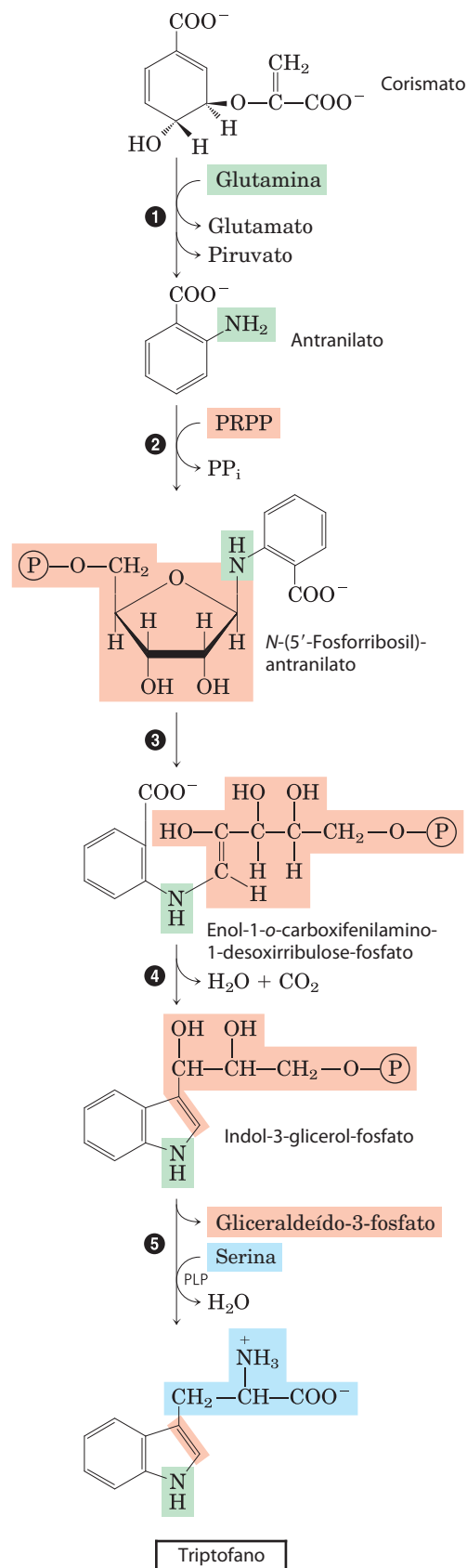
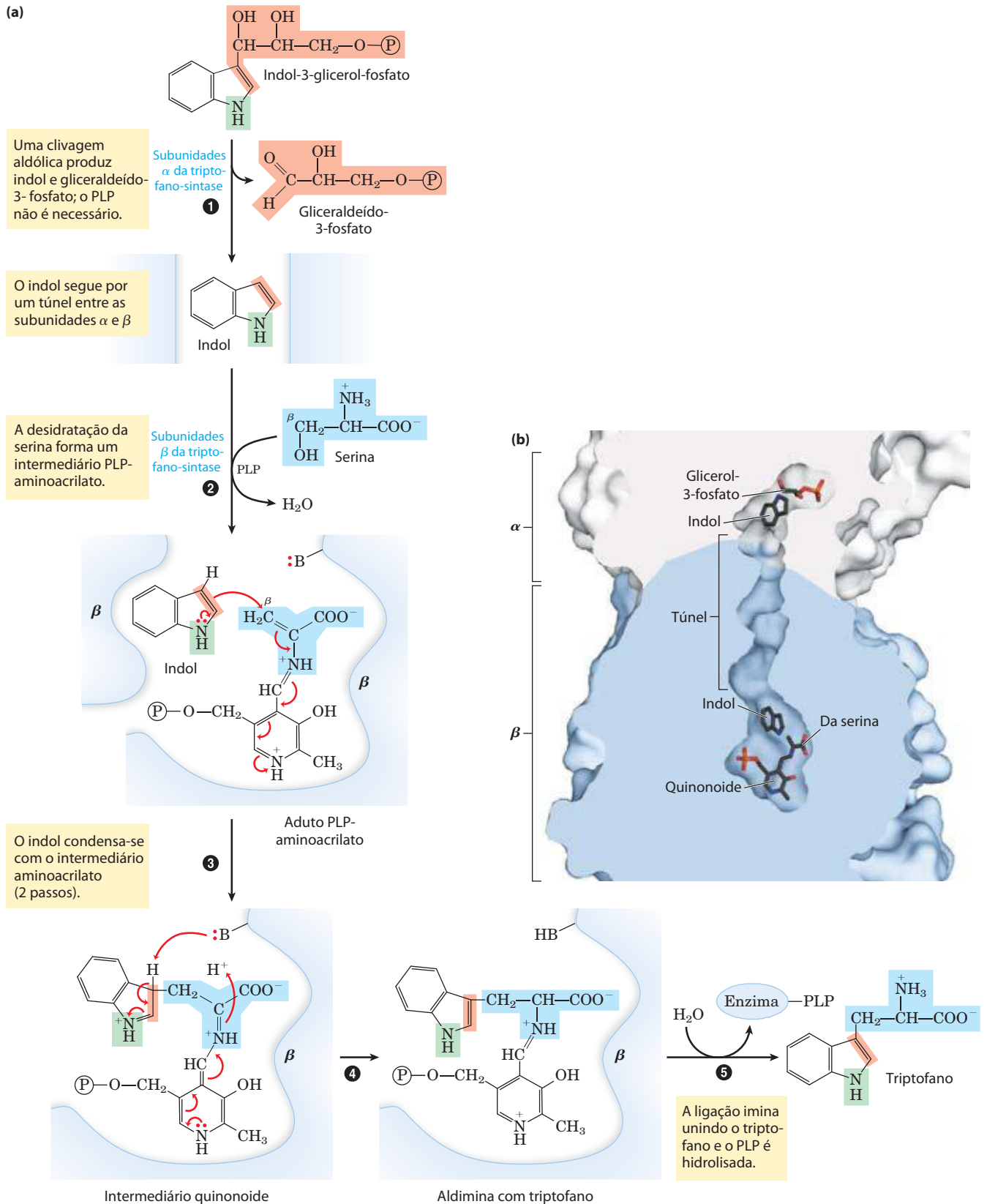



**FIGURA 22-19 Biossíntese de triptofano a partir de corismato em bactérias e plantas.** Na *E. coli*, as enzimas que catalisam as etapas ❶ e ❷ são subunidades de um complexo único.

**MECANISMO – FIGURA 22-20 Reação da triptofano-sintase.** **(a)** Esta enzima catalisa uma reação envolvendo múltiplos passos e diversos tipos de rearranjos químicos. As transformações facilitadas pelo PLP ocorrem no carbono $\beta$ (C-3) do aminoácido, ao contrário das reações descritas na Figura 18-6, que ocorrem no carbono $\alpha$. O carbono $\beta$ da serina é ligado ao sistema indólico de anéis. **(b)** (PDB ID 1KFJ) O indol gerado na subunidade $\alpha$ (branco) move-se por um túnel até a subunidade $\beta$ (azul), onde se condensa com a porção serina. **Mecanismo da triptofano-sintase**

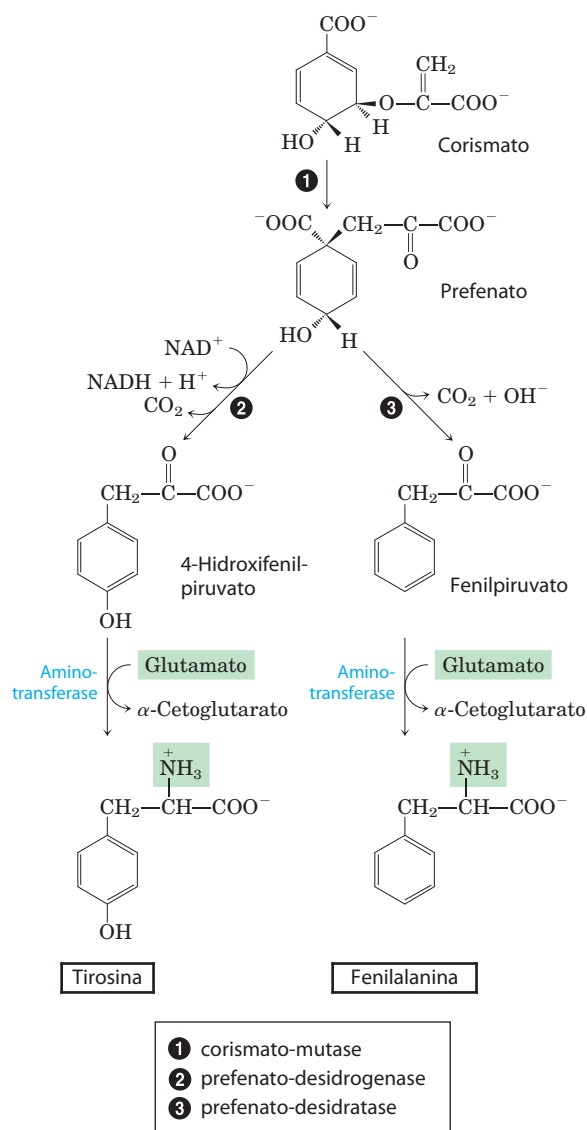



**FIGURA 22-21 Biossíntese de fenilalanina e tirosina a partir de corismato em bactérias e plantas.** A conversão do corismato em prefenato é um exemplo biológico raro de um rearranjo de Claisen.

as enzimas que catalisam os dois primeiros passos da ramificação que leva ao triptofano estão sujeitas à inibição alostérica pelo triptofano.

## RESUMO 22.2 Biossíntese de aminoácidos

- Plantas e bactérias sintetizam todos os 20 aminoácidos comuns. Os mamíferos podem sintetizar cerca de metade deles, os demais devem estar presentes na dieta (aminoácidos essenciais).
- Entre os aminoácidos não essenciais, o glutamato é formado por aminação redutora do $\alpha$-cetoglutarato e serve como precursor de glutamina, prolina e arginina. Alanina e aspartato (e assim também a asparagina) são formados a partir do piruvato e do oxaloacetato, respectivamente, por transaminação. A cadeia carbonada da serina é derivada do 3-fosfoglicerato. A serina é precursora da glicina; o átomo de carbono $\beta$ da serina é transferido para o tetra-hidrofolato. Em microrganismos, a cisteína é produzida a partir de serina e de sulfeto, produzido pela redução de sulfato obtido do ambiente. Os mamíferos produzem cisteína a partir de metionina e serina, por uma série de reações que requer *S*-adenosilmetionina e cistationina.
- Entre os aminoácidos essenciais, os aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) são produzidos por uma via em que o corismato representa um ponto-chave de ramificação. O fosforribosil-pirofosfato é precursor do triptofano e da histidina. A via da histidina está interconectada com a via de síntese de purinas. A tirosina também pode ser produzida por hidroxilação da fenilalanina (e, por isso, é considerada um aminoácido condicionalmente essencial). As vias para os demais aminoácidos essenciais são complexas.
- As vias de biossíntese de aminoácidos estão sujeitas à inibição alostérica pelo produto final; a enzima reguladora geralmente é a primeira da sequência. A regulação das várias vias sintéticas é coordenada.

## 22.3 Moléculas derivadas de aminoácidos

Além de seu papel como blocos constitutivos das proteínas, os aminoácidos são precursores de muitas biomoléculas especializadas, incluindo hormônios, coenzimas, nucleotídeos, alcaloides, polímeros constituintes da parede celular, porfirinas, antibióticos, pigmentos e neurotransmissores. Aqui serão descritas as vias de síntese de diversos desses derivados de aminoácidos.

### A glicina é precursora das porfirinas

A biossíntese de **porfirinas**, para as quais a glicina é um importante precursor, é nosso primeiro exemplo, devido à importância central do núcleo das porfirinas nas hemeproteínas, como a hemoglobina e os citocromos. As porfirinas são sintetizadas a partir de quatro moléculas do derivado monopirrólico **porfobilinogênio**, o qual é derivado de duas moléculas de $\delta$-aminolevulinato. Há duas vias principais para o $\delta$-aminolevulinato. Em eucariotos superiores (**Figura 22-25a**), a glicina reage com succinil-CoA na primeira etapa da via, produzindo $\alpha$-amino-$\beta$-cetoadipato, que é então descarboxilado, produzindo $\delta$-aminolevulinato. Em plantas, algas e na maioria das bactérias, o $\delta$-aminolevulinato é formado a partir do glutamato (Figura 22-25b). O glutamato é inicialmente esterificado, originando glutamil-$tRNA^{Glu}$ (ver, no Capítulo 27, o tópico referente ao RNA transportador); a redução pelo NADPH converte o glutamato em 1-semialdeído do glutamato, o qual é clivado do tRNA. Uma aminotransferase converte o 1-semialdeído do glutamato em $\delta$-aminolevulinato.

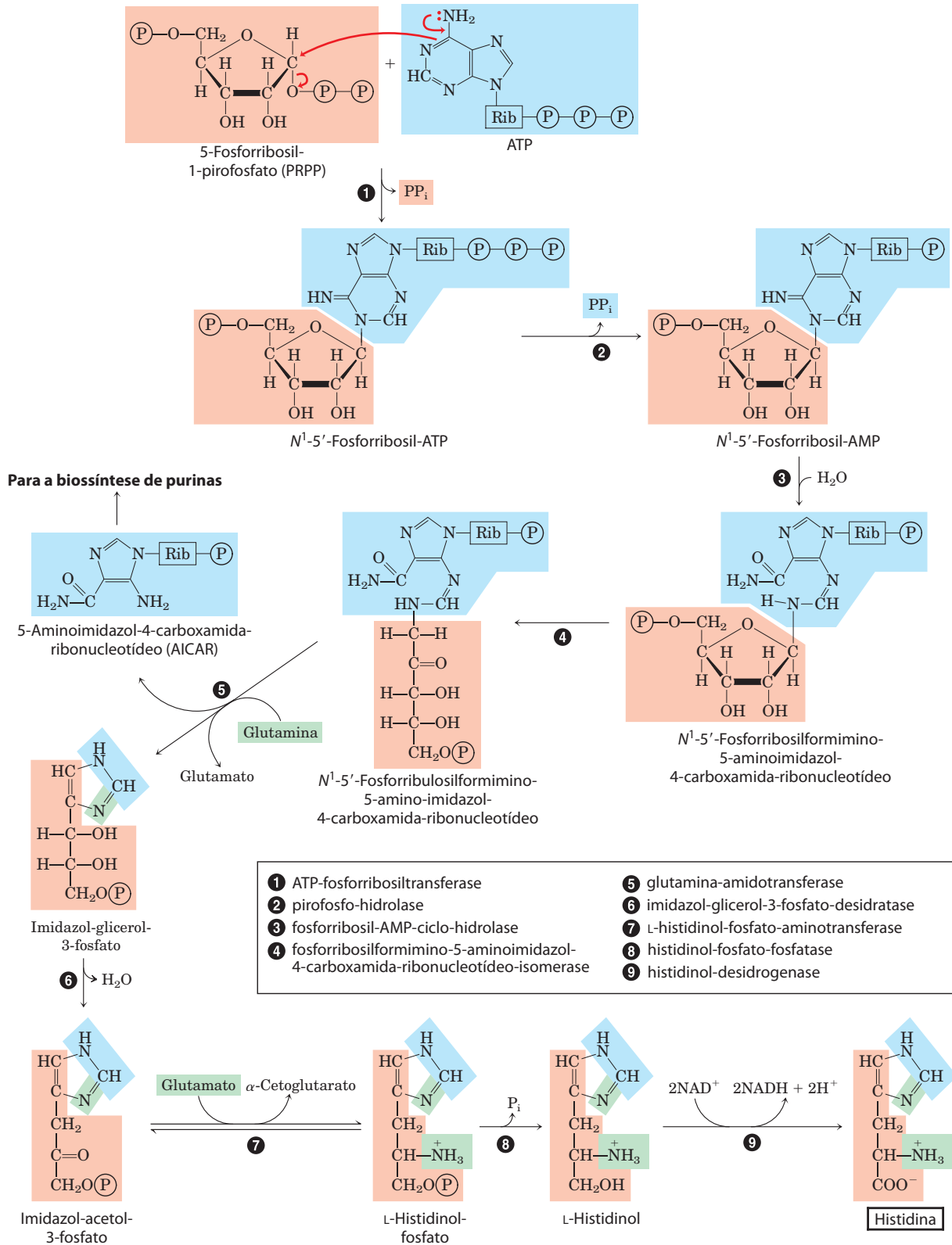



**FIGURA 22-22 Biossíntese de histidina em bactérias e plantas.** Átomos originários do PRPP e do ATP estão sombreados em cor salmão e azul, respectivamente. Dois nitrogênios da histidina provêm da glutamina e do glutamato (em verde). Observe que o derivado do ATP que resta após a etapa ❺ (AICAR) é um intermediário da biossíntese de purinas (ver Figura 22-35, etapa ❾), de modo que o ATP é rapidamente regenerado.

$CH_3—CH(OH)—CH(\overset{+}{N}H_3)—COO^-$ Treonina

↓ Treonina-desidratase (⊗)

$CH_3—CH_2—C(=O)—COO^-$ α-Cetobutirato

↓ 5 etapas

$CH_3—CH_2—CH(CH_3)—CH(\overset{+}{N}H_3)—COO^-$ Isoleucina

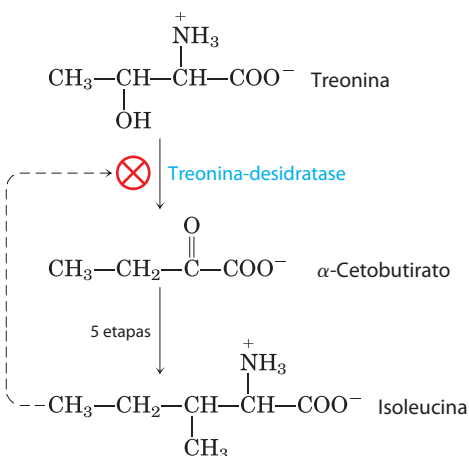



**FIGURA 22-23 Regulação alostérica da biossíntese de isoleucina.** A primeira reação da via desde a treonina até a isoleucina é inibida pelo produto final, a isoleucina. Esse foi um dos primeiros exemplos descobertos de inibição alostérica por retroalimentação. As etapas desde o α-cetobutirato até a isoleucina correspondem às etapas ⓲ a ㉑ na Figura 22-17 (perfazendo cinco etapas, pois ⓳ é uma reação de duas etapas).

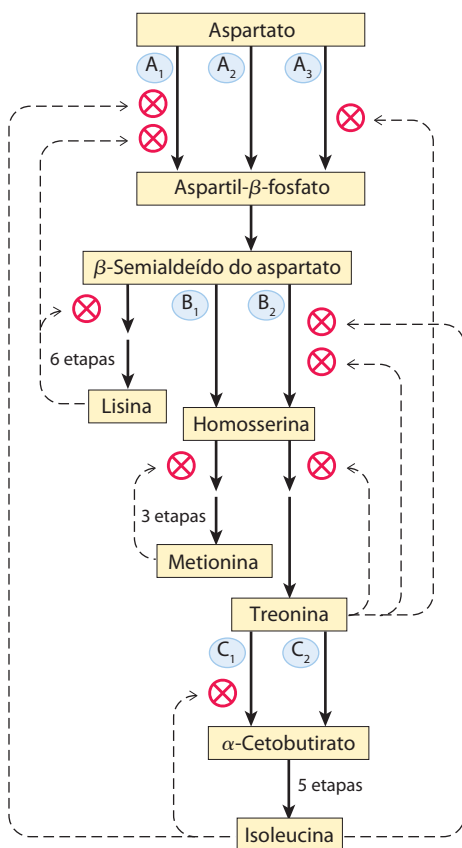



**FIGURA 22-24 Mecanismos reguladores interconectados na biossíntese de diversos aminoácidos derivados do aspartato em *E. coli*.** Três enzimas (A, B e C) têm duas ou três isoformas, indicadas pelos subscritos numéricos. Em cada caso, uma das isoformas ($A_2$, $B_1$ e $C_2$) não apresenta regulação alostérica; essas isoenzimas são reguladas por alterações na quantidade de enzima sintetizada (Capítulo 28). A síntese das isoenzimas $A_2$ e $B_1$ é reprimida quando os níveis de metionina estão altos, e a síntese da isoenzima $C_2$ é reprimida quando os níveis de isoleucina estão altos. A enzima A é a aspartato-cinase, a enzima B é a homosserina-desidrogenase e a enzima C é a treonina-desidratase.

Em todos os organismos, duas moléculas de δ-aminolevulinato se condensam para formar porfobilinogênio e, por meio de uma série de reações enzimáticas complexas, quatro moléculas de porfobilinogênio se unem, formando **protoporfirina** (**Figura 22-26**). O átomo de ferro é incorporado após a protoporfirina ter sido formada, em um passo catalisado pela ferroquelatase. A biossíntese de porfirinas é regulada nos eucariotos superiores pela concentração do produto heme, o qual serve como inibidor por retroalimentação dos passos iniciais da via de síntese. Defeitos genéticos na biossíntese de porfirinas podem levar ao acúmulo de intermediários da via, causando várias doenças humanas conhecidas coletivamente como **porfirias** (Quadro 22-2).

## O grupo heme é fonte dos pigmentos biliares

O grupo ferro-porfirina (heme) da hemoglobina, liberado no baço a partir de eritrócitos em degeneração, é degradado, produzindo $Fe^{2+}$ livre e, por fim, **bilirrubina**. Essa via é surpreendente por sua capacidade de conferir cor à bioquímica humana.

O primeiro passo, nessa via de duas etapas, é catalisado pela hemeoxigenase, que converte heme em biliverdina, derivado tetrapirrólico linear (aberto) (**Figura 22-27**). Os demais produtos da reação são $Fe^{2+}$ livre e CO. O $Fe^{2+}$ é rapidamente ligado à ferritina. O monóxido de carbono é um tóxico que se liga à hemoglobina (ver Quadro 5-1), e a produção de CO pela hemeoxigenase assegura que, mesmo na ausência de exposição ambiental, cerca de 1% do heme de uma pessoa esteja complexado ao CO.

A biliverdina é convertida em bilirrubina no segundo passo, catalisado pela biliverdina-redutase. Você pode monitorar essa reação colorimetricamente em um experimento *in situ* bastante familiar. Quando você sofre um machucado que resulta em hematoma, a cor negra e/ou púrpura resulta da hemoglobina liberada pelos eritrócitos danificados. Com o tempo, a cor muda para o verde da biliverdina e, após, para o amarelo da bilirrubina. A bilirrubina é bastante insolúvel, sendo transportada na corrente sanguínea complexada com a albumina sérica. No fígado, a bilirrubina é transformada no pigmento da bile, bilirrubina-diglicuronato. Esse produto é suficientemente hidrossolúvel para ser secretado com outros componentes da bile para o intestino delgado, onde enzimas microbianas o convertem em diversos produtos, predominantemente urobilinogênio. Algum urobilinogênio é absorvido e chega ao sangue, sendo transportado até os rins, onde é convertido em urobilina, o componente que confere à urina sua coloração amarela (Figura 22-27). O urobilinogênio que permanece no intestino é convertido (em outra reação dependente dos microrganismos da flora intestinal) em estercobilina (Figura 22-27), que confere às fezes a cor marrom-avermelhada.

Insuficiência da função hepática ou bloqueio da secreção de bile determina o extravasamento da bilirrubina do fígado para o sangue, resultando em coloração amarela da pele e da esclera dos olhos, condição denominada icterícia. Em casos de icterícia, a determinação da concentração de bilirrubina no sangue pode ser útil para o diagnóstico da doença hepática subjacente. Bebês recém-nascidos algu-

**(a)**

$COO^-$ — $CH_2$ — $CH_2$ — C—S-CoA (=O) + $CH_2$—$\overset{+}{N}H_3$ / $COO^-$ → (CoA-SH; δ-aminolevulinato-sintase) → [$COO^-$ — $CH_2$ — $CH_2$ — C=O — CH—$\overset{+}{N}H_3$ — $COO^-$] → ($CO_2$; δ-aminolevulinato-sintase) → $COO^-$ — $CH_2$ — $CH_2$ — C=O — $CH_2$ — $^+NH_3$

Succinil-CoA | Glicina | α-Amino-β-cetoadipato | δ-Aminolevulinato

glutamato 1-semialdeído aminomutase

**(b)**

$COO^-$ — $CH_2$ — $CH_2$ — HC—$\overset{+}{N}H_3$ — $COO^-$ → ($RNAt^{Glu}$, ATP → AMP + $PP_i$; Glutamil-tRNA-sintetase) → $COO^-$ — $CH_2$ — $CH_2$ — HC—$\overset{+}{N}H_3$ — C=O — $tRNA^{Glu}$ → (NADPH + $H^+$ → $NADP^+$, $RNAt^{Glu}$; Glutamil-tRNA-redutase) → $COO^-$ — $CH_2$ — $CH_2$ — HC—$\overset{+}{N}H_3$ — C=O — H

Glutamato | Glutamil-$tRNA^{Glu}$ | 1-Semialdeído do glutamato

**FIGURA 22-25 Biossíntese do δ-aminolevulinato. (a)** Na maioria dos animais, incluindo os mamíferos, o δ-aminolevulinato é sintetizado a partir de glicina e succinil-CoA. Os átomos fornecidos pela glicina são mostrados em cor-de-rosa. **(b)** Em bactérias e plantas, o precursor do δ-aminolevulinato é o glutamato.

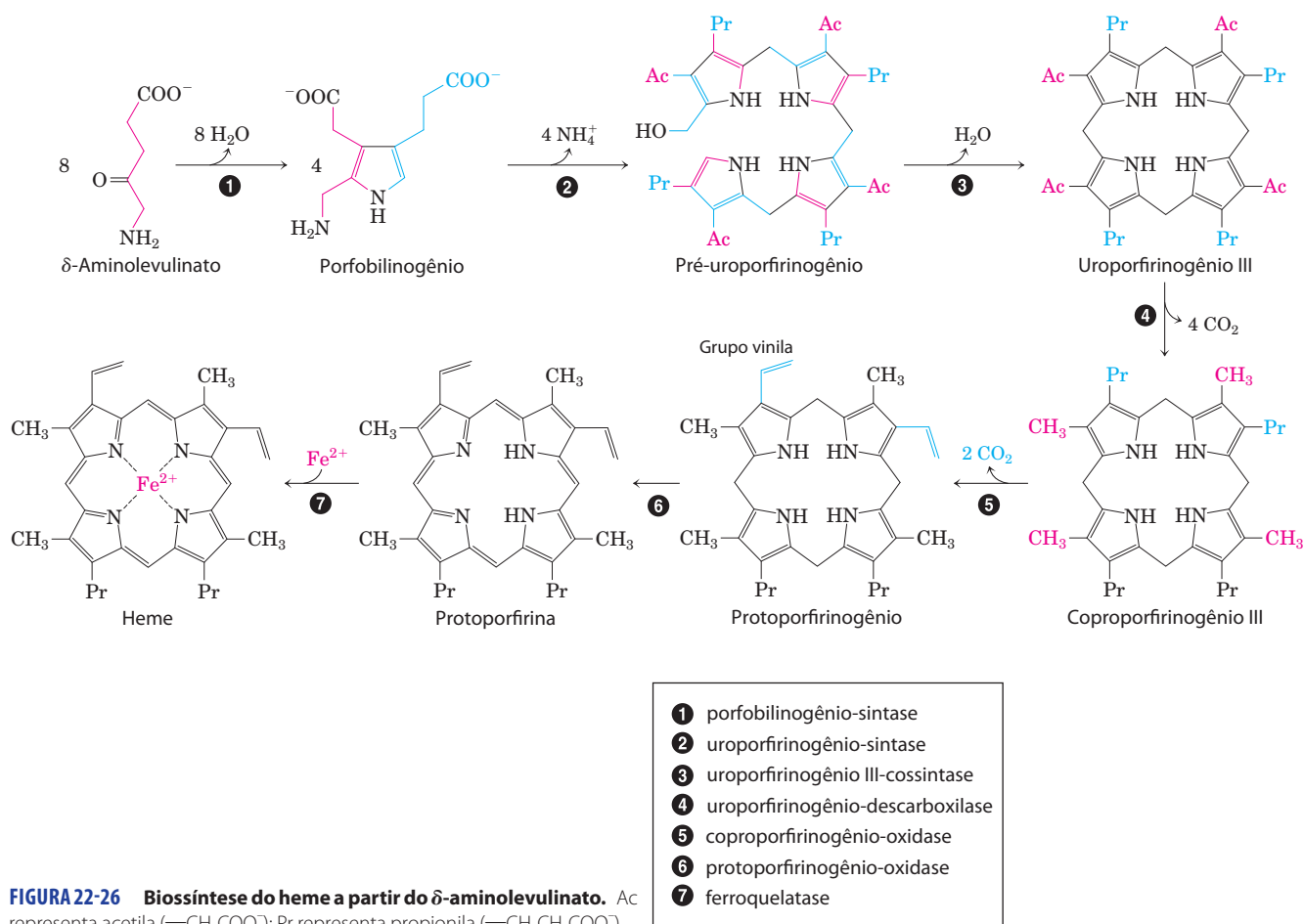
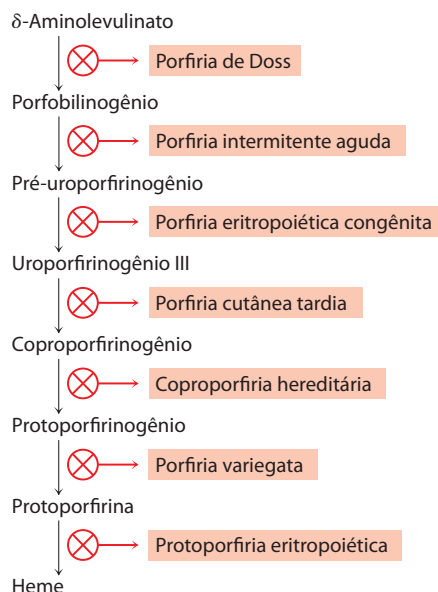



**FIGURA 22-26 Biossíntese do heme a partir do δ-aminolevulinato.** Ac representa acetila (—$CH_2COO^-$); Pr representa propionila (—$CH_2CH_2COO^-$).

**QUADRO 22-2**  **MEDICINA** **Sobre reis e vampiros**

As porfirias são um grupo de doenças genéticas que resultam de defeitos em enzimas da via biossintética da glicina às porfirinas; precursores específicos de porfirinas acumulam-se nos eritrócitos, nos fluidos corporais e no fígado. A forma mais comum é a porfiria intermitente aguda. A maioria das pessoas que herdam essa condição é heterozigota e, em geral, assintomática, pois a única cópia normal do gene fornece um nível suficiente de função enzimática. Contudo, certos fatores nutricionais ou ambientais (ainda não completamente esclarecidos) podem levar a um aumento de δ-aminolevulinato e porfobilinogênio, levando a crises de dor abdominal aguda e disfunção neurológica. O rei George III, monarca britânico durante a guerra da independência dos Estados Unidos, sofria de graves episódios de aparente loucura, que embaçaram o registro histórico desse homem talentoso. Os sintomas de sua condição sugerem que George III sofria de porfiria intermitente aguda.

Uma das mais raras porfirias resulta de um acúmulo de uroporfirinogênio I, isômero anormal de um precursor da protoporfirina. Esse composto cora a urina de vermelho, faz os dentes fluorescerem fortemente sob luz ultravioleta e torna a pele anormalmente sensível à luz do sol. Muitas pessoas com essa porfiria são anêmicas, pois é sintetizada uma quantidade insuficiente de heme. Essa condição genética pode ter originado os mitos dos vampiros nas lendas folclóricas.

Os sintomas da maioria das porfirias atualmente são controlados com facilidade com a manipulação da dieta ou com a administração de heme ou de derivados do heme.

mas vezes desenvolvem icterícia por ainda não produzirem quantidades suficientes de glicuronil-bilirrubina-transferase para processar sua bilirrubina. Um tratamento tradicional para reduzir o excesso de bilirrubina consiste na exposição a uma lâmpada fluorescente, que leva à conversão fotoquímica da bilirrubina em compostos mais solúveis e, portanto, mais facilmente excretáveis.

Essas vias da degradação do heme desempenham papéis significativos na proteção das células contra dano oxidativo e na regulação de certas funções celulares. O CO produzido pela hemeoxigenase é tóxico em altas concentrações; contudo, em concentrações muito baixas, como aquelas resultantes da degradação do heme, esse composto parece ter algumas funções reguladoras e/ou de sinalização. O CO atua como vasodilatador, de modo semelhante ao óxido nítrico (discutido a seguir), embora com menor potência. Baixos níveis de CO também têm alguns efeitos reguladores sobre a neurotransmissão. A bilirrubina é o antioxidante mais abundante nos tecidos dos mamíferos, sendo responsável pela maior parte da atividade antioxidante no soro. Seus efeitos protetores parecem ser especialmente importantes para o cérebro em desenvolvimento dos bebês recém-nascidos. A toxicidade celular associada à icterícia pode ser devida ao fato de os níveis de bilirrubina excederem os níveis de albumina sérica necessários para solubilizar esse composto.

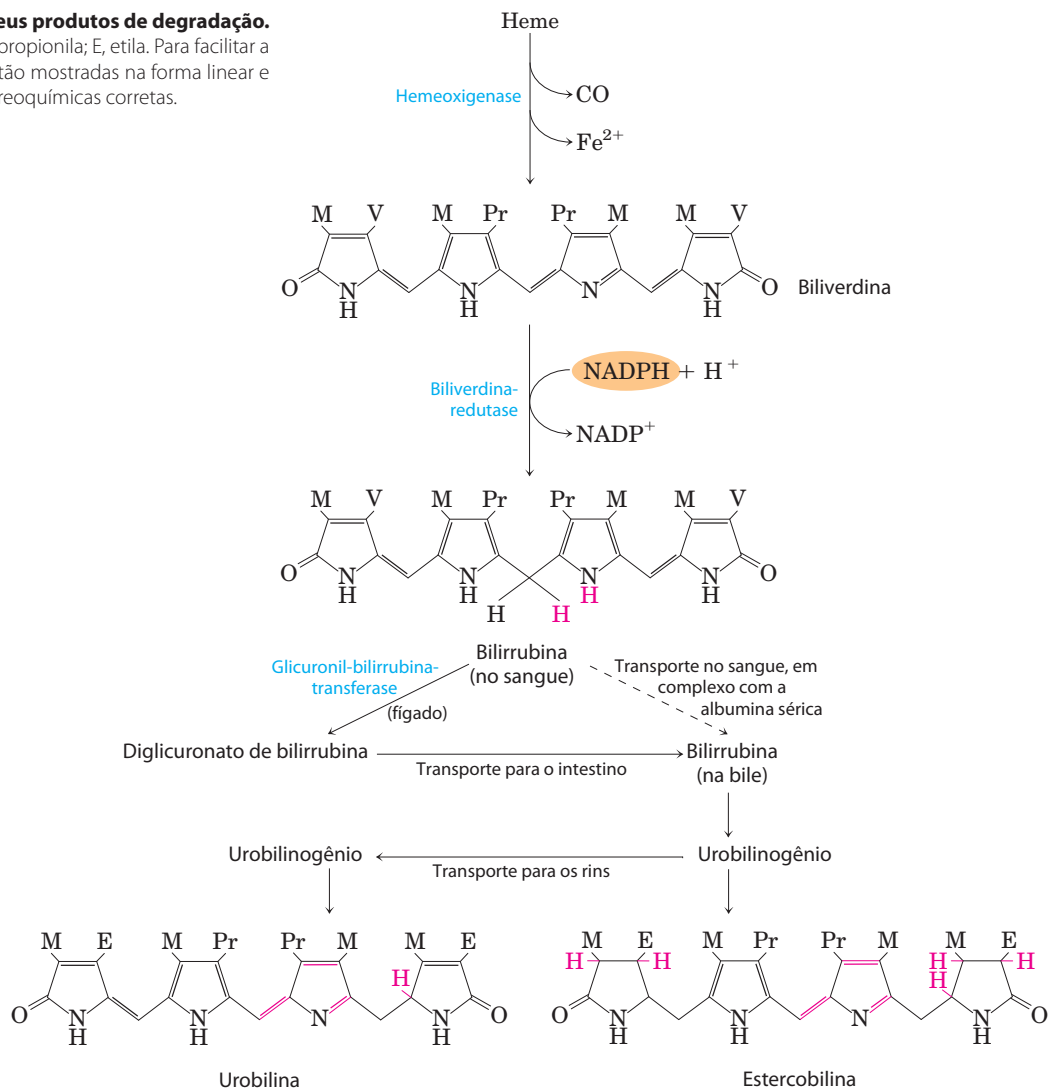
Considerando esses vários papéis para os produtos da degradação do heme, a via de degradação está sujeita à regulação, principalmente em seu primeiro passo. Os humanos possuem pelo menos três isoenzimas da hemeoxigenase (HO). A HO-1 é altamente regulada; a expressão de seu gene é induzida por uma ampla gama de condições relacionadas ao estresse (estresse hemodinâmico, angiogênese [desenvolvimento descontrolado de vasos sanguíneos], hipoxia, hiperóxia, choque térmico, exposição à radiação ultravioleta, peróxido de hidrogênio e muitos outros ataques metabólicos). A HO-2 é encontrada principalmente no encéfalo e nos testículos, onde é expressa constitutivamente. A terceira isoenzima, a HO-3, ainda não está bem caracterizada. ■

## Os aminoácidos são precursores da creatina e da glutationa

A **fosfocreatina**, derivada da **creatina**, é um importante tampão energético no músculo esquelético (ver Quadro 23-2). A creatina é sintetizada a partir da glicina e da arginina (**Figura 22-28**); a metionina, na forma de *S*-adenosilmetionina, atua como doadora do grupo metila.

A **glutationa** (**GSH**), presente em plantas, animais e em algumas bactérias, frequentemente em níveis altos, pode ser considerada um tampão redox, sendo derivada dos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina (**Figura 22-29**). O grupo $\gamma$-carboxila do glutamato é ativado pelo ATP, formando um intermediário acil-fosfato, que é então atacado pelo grupo $\alpha$-amino da cisteína. Uma segunda reação de condensação se segue, com o grupo $\alpha$-carboxila da cisteína ativado na forma de acil-fosfato, permitindo a reação com a

Heme
Hemeoxigenase
CO
$Fe^{2+}$
Biliverdina
Biliverdina-redutase
NADPH + $H^+$
$NADP^+$
Bilirrubina (no sangue)
Glicuronil-bilirrubina-transferase
(fígado)
Transporte no sangue, em complexo com a albumina sérica
Diglicuronato de bilirrubina
Transporte para o intestino
Bilirrubina (na bile)
Urobilinogênio
Transporte para os rins
Urobilinogênio
Urobilina
Estercobilina

**FIGURA 22-27** **Bilirrubina e seus produtos de degradação.** M representa metila; V, vinila; Pr, propionila; E, etila. Para facilitar a comparação, estas estruturas estão mostradas na forma linear e não em suas conformações estereoquímicas corretas.

glicina. A forma oxidada da glutationa (GSSG), produzida no curso de suas atividades redox, contém duas moléculas de glutationa ligadas por meio de uma ligação dissulfeto.

A glutationa provavelmente ajuda a manter os grupos sulfidrila das proteínas no estado reduzido e o ferro do heme no estado ferroso ($Fe^{2+}$), servindo como agente redutor para a glutarredoxina na síntese de desoxirribonucleotídeos (ver Figura 22-41). Sua função redox também é utilizada para remover peróxidos tóxicos formados durante o curso normal do crescimento e do metabolismo em condições aeróbias:

$$2\ GSH + R—O—O—H \longrightarrow GSSG + H_2O + R—OH$$

Essa reação é catalisada pela **glutationa-peroxidase**, enzima notável pelo fato de conter um átomo de selênio (Se) covalentemente ligado, na forma de selênio-cisteína (ver Figura 3-8a), essencial para sua atividade.

## D-Aminoácidos são encontrados basicamente em bactérias

Embora D-aminoácidos geralmente não ocorram em proteínas, eles têm algumas funções especiais na estrutura das paredes celulares bacterianas e em antibióticos peptídicos. Peptidoglicanos bacterianos (ver Figura 20-30) contêm D-alanina e D-glutamato. Os D-aminoácidos são produzidos diretamente a partir dos isômeros L, pela ação de aminoácido-racemases, que têm piridoxal-fosfato como cofator (ver Figura 18-6). A racemização de aminoácidos é de grande importância para o metabolismo bacteriano, e enzimas como a alanina-racemase são alvos importantes para agentes farmacêuticos. Um desses agentes, a **L-fluoralanina**, está sendo testado como fármaco antibacteriano. Outro, a **ciclosserina**, é utilizado no tratamento da tuberculose. Contudo, uma vez que esses inibidores também afetam algumas enzimas humanas que utilizam PLP, eles potencialmente apresentam efeitos colaterais indesejáveis. ■

L-Fluoralanina

Ciclosserina

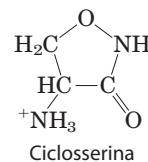
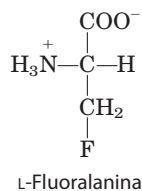
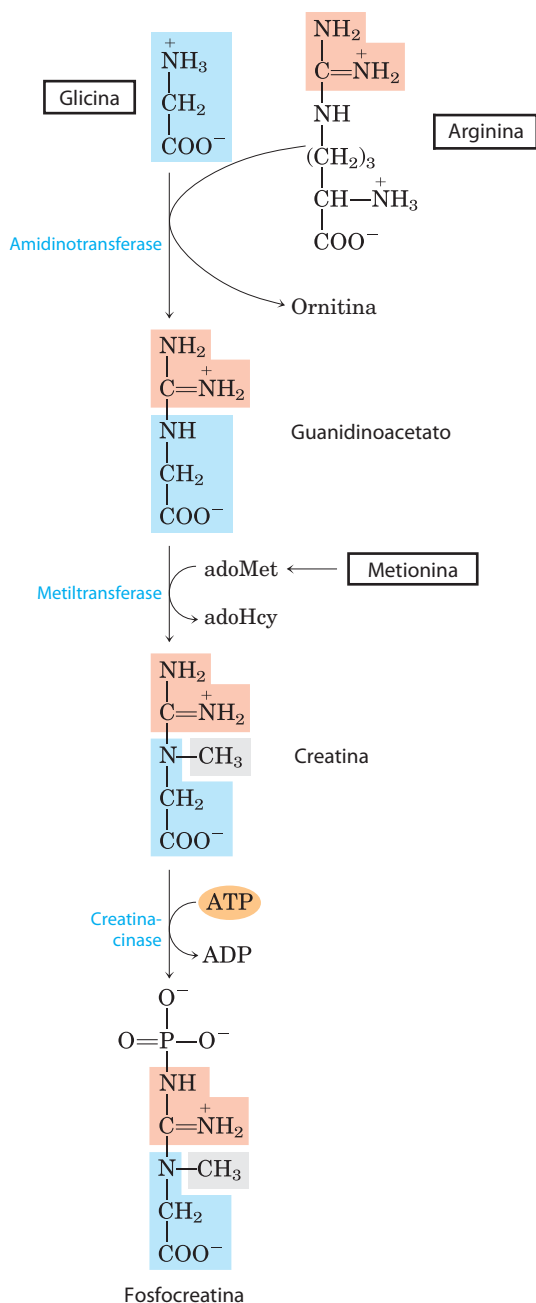



FIGURA 22-28 **Biossíntese de creatina e fosfocreatina.** A creatina é sintetizada a partir de três aminoácidos: glicina, arginina e metionina. Esta via mostra a versatilidade dos aminoácidos como precursores de outras biomoléculas nitrogenadas.

FIGURA 22-29 **Metabolismo da glutationa.** **(a)** Biossíntese da glutationa. **(b)** Forma oxidada da glutationa.

## Aminoácidos aromáticos são precursores de muitas substâncias de origem vegetal

A fenilalanina, a tirosina e o triptofano são convertidos em vários compostos importantes nas plantas. O polímero rígido **lignina**, derivado da fenilalanina e da tirosina, está atrás apenas da celulose em abundância nos tecidos vegetais. A estrutura do polímero de lignina é complexa e não está bem esclarecida. O triptofano também é o precursor do hormônio de crescimento em plantas, o indol-3-acetato, ou **auxina** (**Figura 22-30a**), importante para a regulação de uma ampla gama de processos biológicos nos vegetais.

A fenilalanina e a tirosina também originam muitos produtos naturais de importância comercial, incluindo os taninos, que inibem a oxidação em vinhos; os alcaloides, como a morfina, que apresenta potentes efeitos fisiológicos; e condimentos ou aromatizantes encontrados em óleo de canela (Figura 22-30b), noz moscada, cravo-da-índia, baunilha, pimenta vermelha e outros produtos.

## Aminas biológicas são produtos da descarboxilação dos aminoácidos

Muitos neurotransmissores importantes são aminas primárias ou secundárias, derivadas de aminoácidos por meio de vias simples. Além disso, algumas poliaminas

Triptofano

Aminotransferase

Indol-3-piruvato

Descarboxilase $CO_2$

Indol-3-acetato (auxina)

(a)

Fenilalanina

Fenilalanina-amônia-liase $NH_3$

Cinamato

(b)

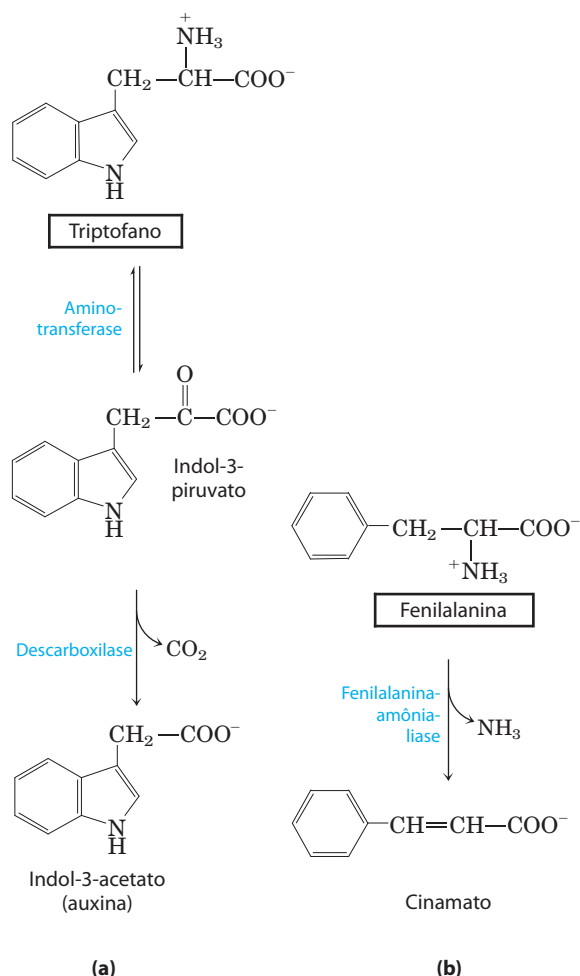



**FIGURA 22-30 Biossíntese de dois compostos vegetais a partir de aminoácidos.** **(a)** Indol-3-acetato (auxina) e **(b)** cinamato (confere aroma à canela).

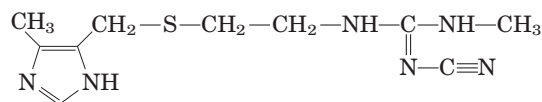
que formam complexos com o DNA são derivadas do aminoácido ornitina, intermediário do ciclo da ureia. Um denominador comum de muitas dessas vias é a descarboxilação dos aminoácidos, outra reação que requer PLP (ver Figura 18-6).

A síntese de alguns neurotransmissores está ilustrada na **Figura 22-31**. A tirosina origina uma família de catecolaminas, que inclui a **dopamina**, a **noradrenalina** e a **adrenalina**. Os níveis das catecolaminas correlacionam-se, entre outras coisas, com variações na pressão sanguínea. A doença de Parkinson, um distúrbio neurológico, está associada com uma menor produção de dopamina e tem sido tradicionalmente tratada pela administração de L-dopa. A produção em excesso de dopamina no cérebro pode estar ligada a transtornos psiquiátricos, como a esquizofrenia.

A descarboxilação do glutamato origina o **ácido γ-aminobutírico** (**GABA**), um neurotransmissor inibitório. Uma baixa produção de GABA está associada com crises epilépticas. Análogos do GABA são utilizados no tratamento da epilepsia e da hipertensão. Pode-se também aumentar os níveis de GABA administrando-se inibidores da enzima de degradação do GABA, a GABA-aminotransferase.

Outro neurotransmissor importante, a **serotonina**, é produzido a partir do triptofano, em uma via constituída por dois passos.

A histidina sofre descarboxilação, originando **histamina**, um poderoso vasodilatador em tecidos animais. A histamina é liberada em grandes quantidades como parte da resposta alérgica e também estimula a secreção ácida no estômago. Um crescente conjunto de agentes farmacêuticos está sendo projetado para interferir com a síntese ou com a ação da histamina. Um exemplo importante é o antagonista do receptor da histamina, a **cimetidina** (Tagamet), um análogo estrutural da histamina:

$$CH_3 \quad CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-\underset{\underset{N-C\equiv N}{\|}}{C}-NH-CH_3$$

Esse composto auxilia na cura de úlceras duodenais pela inibição da secreção gástrica de ácido.

Poliaminas, como a **espermina** e a **espermidina**, envolvidas na condensação do DNA, são derivadas da metionina e da ornitina pela via mostrada na **Figura 22-32**. O primeiro passo é a descarboxilação da ornitina, um precursor da arginina (Figura 22-12). A **ornitina-descarboxilase**, uma enzima que requer PLP, é alvo de diversos inibidores poderosos utilizados como agentes farmacêuticos (ver Quadro 6-3). ■

## A arginina é precursora na síntese biológica de óxido nítrico

Um achado surpreendente, em meados da década de 1980, foi o papel do óxido nítrico (NO) – anteriormente apenas conhecido como componente poluidor do ar – como importante mensageiro biológico. Essa substância gasosa simples difunde-se facilmente através das membranas, embora sua alta reatividade restrinja seu raio de difusão para cerca de 1 mm a partir de seu ponto de síntese. Em humanos, o NO desempenha papéis em uma ampla gama de processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão, coagulação sanguínea e controle da pressão sanguínea. Seu modo de ação é descrito no Capítulo 12 (ver Seção 12.4).

O óxido nítrico é sintetizado a partir da arginina em uma reação dependente de NADPH, catalisada pela óxido-nítrico-sintase (**Figura 22-33**), enzima dimérica estruturalmente relacionada à NADPH-citocromo-P-450-redutase (ver Quadro 21-1). A reação é uma oxidação com transferência de cinco elétrons. Cada subunidade da enzima contém ligada uma molécula de cada um de quatro diferentes cofatores: FMN, FAD, tetra-hidrobiopterina e heme contendo $Fe^{3+}$. O NO é uma molécula instável e não pode ser armazenado. Sua síntese é estimulada pela interação da óxido-nítrico-sintase com $Ca^{2+}$-calmodulina (ver Figura 12-11).

## RESUMO 22.3 Moléculas derivadas de aminoácidos

- Muitas biomoléculas importantes são derivadas dos aminoácidos. A glicina é um precursor de porfirinas. A degradação do heme (ferro-porfirina) produz a bilirrubina, que é convertida em pigmentos biliares, com diversas funções fisiológicas.

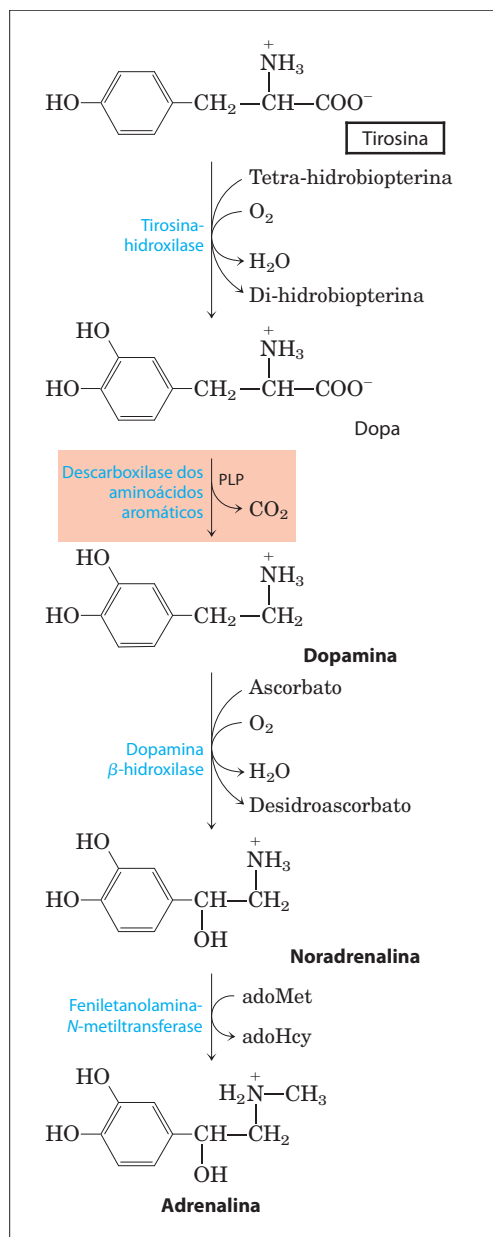
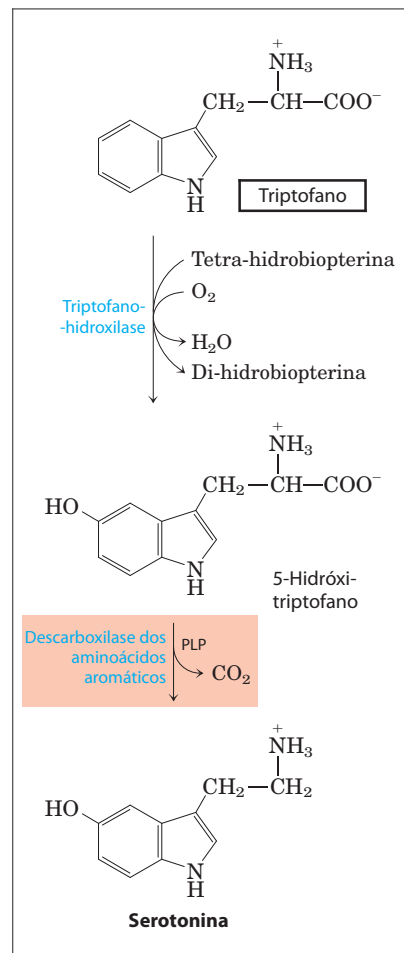
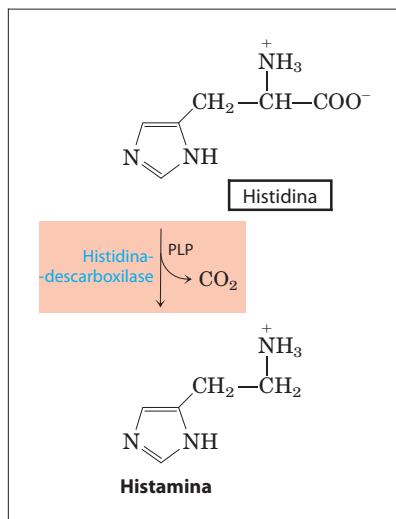
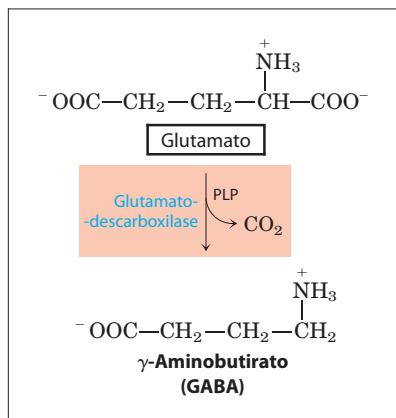



**FIGURA 22-31 Biossíntese de alguns neurotransmissores a partir de aminoácidos.** Em cada caso, o passo-chave é o mesmo: uma descarboxilação dependente de PLP (sombreada em cor salmão).

- A glicina e a arginina originam a creatina e a fosfocreatina, um tampão energético. A glutationa, formada a partir de três aminoácidos, é um importante agente redutor na célula.
- As bactérias sintetizam D-aminoácidos a partir de L-aminoácidos, por meio de reações de racemização que requerem piridoxal-fosfato. Os D-aminoácidos são comumente encontrados em certas paredes bacterianas e em certos antibióticos.
- Os aminoácidos aromáticos originam muitas substâncias nos vegetais. A descarboxilação dependente de PLP de alguns aminoácidos produz importantes aminas biológicas, incluindo neurotransmissores.
- A arginina é precursora do óxido nítrico, um mensageiro biológico.

## 22.4 Biossíntese e degradação de nucleotídeos

Como discutido no Capítulo 8, os nucleotídeos apresentam uma variedade de importantes funções em todas as células. Eles são precursores do DNA e do RNA; são carreadores essenciais de energia química – papel desempenhado basicamente pelo ATP e, em parte, pelo GTP; são componentes dos cofatores NAD, FAD, *S*-adenosilmetionina e coenzima A, assim como de intermediários biossintéticos ativados, como UDP-glicose e CDP-diacilglicerol; e alguns deles, como o cAMP e o cGMP, são também segundos-mensageiros celulares.

Dois tipos de vias levam aos nucleotídeos: as **vias *de novo*** e as **vias de salvação**. A síntese *de novo* dos nucleotídeos inicia com seus precursores metabólicos: aminoácidos, ribose-5-fosfato, $CO_2$ e $NH_3$. As vias de salvação

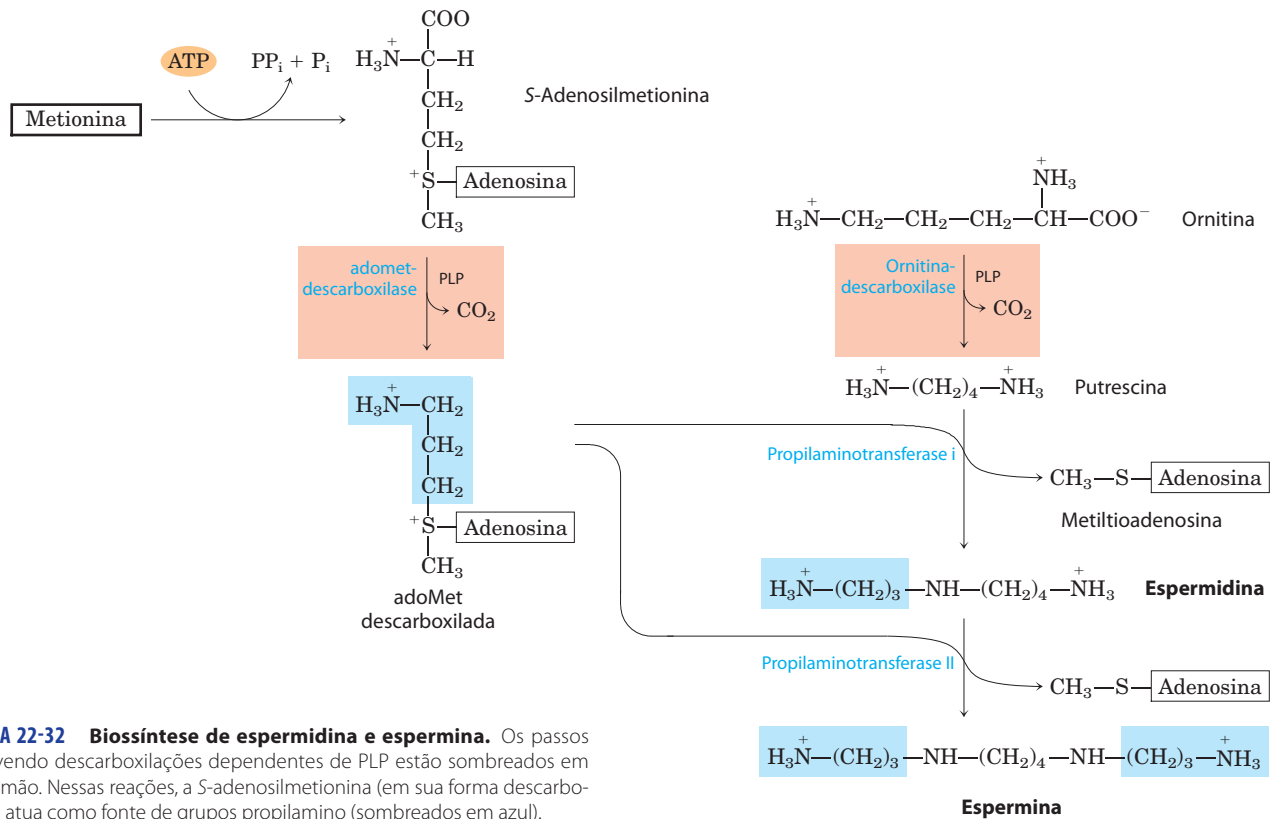



**FIGURA 22-32 Biossíntese de espermidina e espermina.** Os passos envolvendo descarboxilações dependentes de PLP estão sombreados em cor salmão. Nessas reações, a *S*-adenosilmetionina (em sua forma descarboxilada) atua como fonte de grupos propilamino (sombreados em azul).

reciclam as bases livres e os nucleosídeos liberados a partir da degradação de ácidos nucleicos. Ambos os tipos de vias são importantes no metabolismo celular e são discutidos nesta seção.

As vias *de novo* para a biossíntese de purinas e pirimidinas parecem ser quase idênticas em todos os organismos vivos. Uma observação notável é que as bases livres guanina, adenina, timina, citidina e uracila *não* são intermediárias nessas vias, isto é, as bases não são sintetizadas e então ligadas à ribose, como se poderia esperar. A estrutura do anel púrico é construída ligada à ribose durante todo o processo, com a adição de um ou de poucos átomos por vez. O anel pirimídico é sintetizado como **orotato**, ligado à ribose-fosfato e, então, convertido nos nucleotídeos pirimídicos comuns necessários para a síntese dos ácidos nucleicos. Embora as bases livres não sejam intermediárias nas vias *de novo*, elas são intermediárias em algumas das vias de salvação.

Diversos precursores importantes são compartilhados pelas vias *de novo* para a síntese de pirimidinas e purinas. O fosforribosil-pirofosfato (PRPP) é importante para a síntese de ambas e, nessas vias, a estrutura da ribose é mantida no nucleotídeo produzido, ao contrário do seu destino nas vias para a biossíntese de triptofano e histidina, discutidas anteriormente. Um aminoácido é um precursor importante em cada tipo de via: a glicina para as purinas e

NADPH + $H^+$, $O_2$ → $NADP^+$, $H_2O$; $\frac{1}{2}$NADPH, $O_2$ → $\frac{1}{2}NADP^+$, $H_2O$ + $NO^{\bullet}$

Arginina — Hidroxiarginina — Citrulina — Óxido nítrico

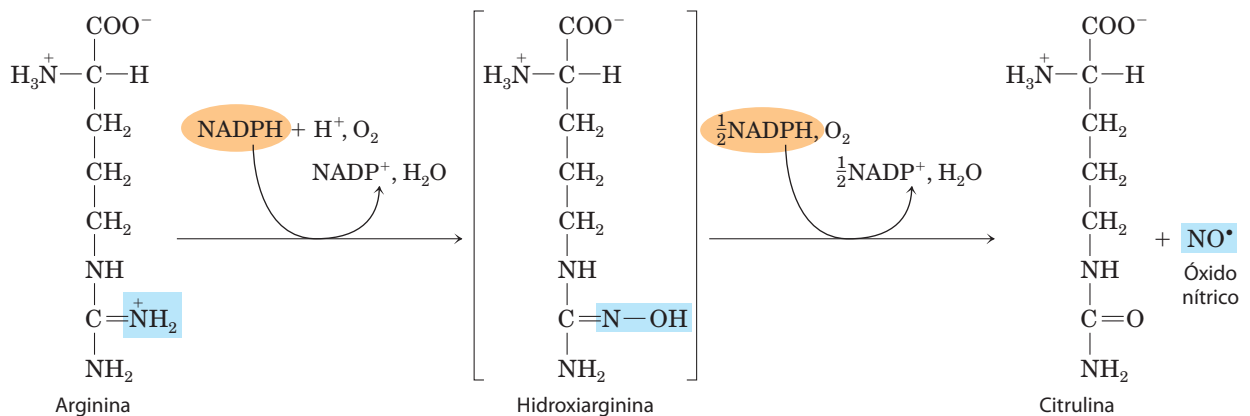



**FIGURA 22-33 Biossíntese de óxido nítrico.** Ambos os passos são catalisados pela óxido-nítrico-sintase. O nitrogênio do NO provém do grupo guanidino da arginina.

o aspartato para as pirimidinas. A glutamina é, novamente, a mais importante fonte de grupos amina – em cinco passos distintos das vias *de novo*. O aspartato também é utilizado como fonte de um grupo amino em dois dos passos das vias das purinas.

Duas outras características devem ser mencionadas. Primeiro, existem evidências, especialmente na via de síntese *de novo* das purinas, de que as enzimas estejam presentes na célula como grandes complexos multienzimáticos, tema recorrente na discussão do metabolismo. Segundo, os conjuntos celulares de nucleotídeos (outros que não o ATP) são bastante pequenos, talvez 1% ou menos das quantidades necessárias para a síntese de DNA celular. Assim sendo, as células devem continuar a sintetizar nucleotídeos durante a síntese de ácidos nucleicos e, em alguns casos, a síntese de nucleotídeos pode limitar as velocidades de replicação e de transcrição do DNA. Em função da importância desses processos nas células em divisão, agentes que inibem a síntese de nucleotídeos se tornaram especialmente importantes em medicina.

Agora serão examinadas as vias biossintéticas para os nucleotídeos púricos e pirimídicos e sua regulação, a formação de desoxinucleotídeos e a degradação de purinas e pirimidinas em ácido úrico e ureia. A seção será finalizada com uma discussão a respeito de agentes quimioterápicos que afetam a síntese de nucleotídeos.

## A síntese *de novo* de nucleotídeos púricos inicia com o PRPP

John M. Buchanan, 1917-2007

Os dois nucleotídeos púricos precursores dos ácidos nucleicos são 5′-monofosfato de adenosina (AMP; adenilato) e 5′-monofosfato de guanosina (GMP; guanilato), os quais contêm as bases púricas adenina e guanina. A **Figura 22-34** mostra a origem dos átomos de carbono e de nitrogênio do sistema de anéis púricos, conforme determinado por John M. Buchanan utilizando experimentos com marcadores isotópicos em aves. A via detalhada para a biossíntese de purinas foi elucidada principalmente por Buchanan e por G. Robert Greenberg, na década de 1950.

No primeiro passo comprometido com a via, um grupo amino, doado pela glutamina, é ligado ao C-1 do PRPP (**Figura 22-35**). A **5-fosforribosilamina** resultante é altamente instável, com meia-vida de 30 segundos em pH 7,5. O anel púrico é depois construído sobre essa estrutura. A via aqui descrita é idêntica em todos os organismos, com exceção de um passo que difere nos eucariotos superiores, como observado a seguir.

O segundo passo é a adição de três átomos doados pela glicina (Figura 22-35, etapa ❷). Um ATP é consumido para ativar o grupo carboxila da glicina (na forma de um acil-fosfato) para essa reação de condensação. O grupo amino da glicina, que foi adicionado, é então formilado pelo

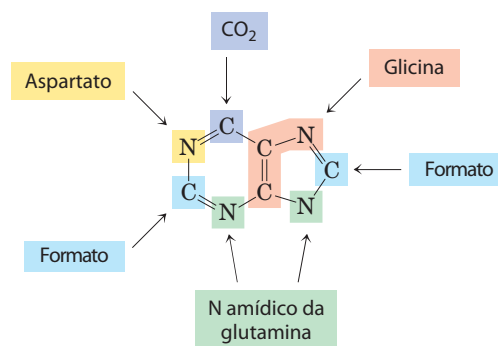



**FIGURA 22-34 Origem dos átomos no anel das purinas.** Esta informação foi obtida a partir de experimentos utilizando isótopos, com precursores marcados com $^{14}C$ ou $^{15}N$. O formato é obtido na forma de $N^{10}$-formiltetra-hidrofolato.

$N^{10}$-formiltetra-hidrofolato (etapa ❸), e um nitrogênio é doado pela glutamina (etapa ❹) antes que a desidratação e o fechamento do anel formem o anel imidazólico do núcleo púrico, com cinco membros, na forma de 5-aminoimidazol-ribonucleotídeo (AIR; etapa ❺).

Nesse ponto, três dos seis átomos necessários para o segundo anel da estrutura das purinas estão colocados no lugar. Para completar o processo, um grupo carboxila é inicialmente adicionado (etapa ❻). Essa carboxilação é incomum pelo fato de não requerer biotina, mas utilizar bicarbonato, geralmente presente em soluções aquosas. Um rearranjo transfere o carboxilato do grupo amino exocíclico para a posição 4 do anel imidazólico (etapa ❼). As etapas 6 e ❼ ocorrem apenas em bactérias e fungos. Em eucariotos superiores, incluindo os humanos, o 5-aminoimidazol-ribonucleotídeo produzido na etapa ❺ é carboxilado diretamente em carboxiaminoimidazol-ribonucleotídeo, em uma única etapa, em vez de duas (etapa ❻a). A enzima que catalisa essa reação é a AIR-carboxilase.

O aspartato agora doa seu grupo amino, em duas etapas (❽ e ❾): formação de uma ligação amida, seguindo-se a eliminação do esqueleto de carbono do aspartato (como fumarato). (Lembre-se de que o aspartato desempenha um papel análogo em duas etapas do ciclo da ureia; ver Figura 18-10.) O último carbono é doado pelo $N^{10}$-formiltetra-hidrofolato (etapa ❿), e ocorre um segundo fechamento de anel, produzindo o segundo anel fundido ao núcleo púrico (etapa ⓫). O primeiro intermediário com um anel púrico completo é o **inosinato** (**IMP**).

Assim como nas vias biossintéticas do triptofano e da histidina, as enzimas da síntese do IMP parecem estar organizadas como grandes complexos multienzimáticos na célula. Novamente, evidências surgem da existência de polipeptídeos únicos com diversas funções, alguns catalisando passos não sequenciais da via. Nas células eucarióticas de organismos como fungos, moscas-da-fruta e galinhas, as etapas ❶, ❸ e ❺ da Figura 22-35 são catalisados por uma proteína multifuncional. Outra proteína multifuncional catalisa as etapas ❿ e ⓫. Em humanos, uma enzima multifuncional combina as atividades da AIR-carboxilase e da SAICAR-sintetase (etapas ❻a e ❽). Nas bactérias, essas atividades são encontradas em proteínas separadas, mas as proteínas podem formar um grande complexo não cova-

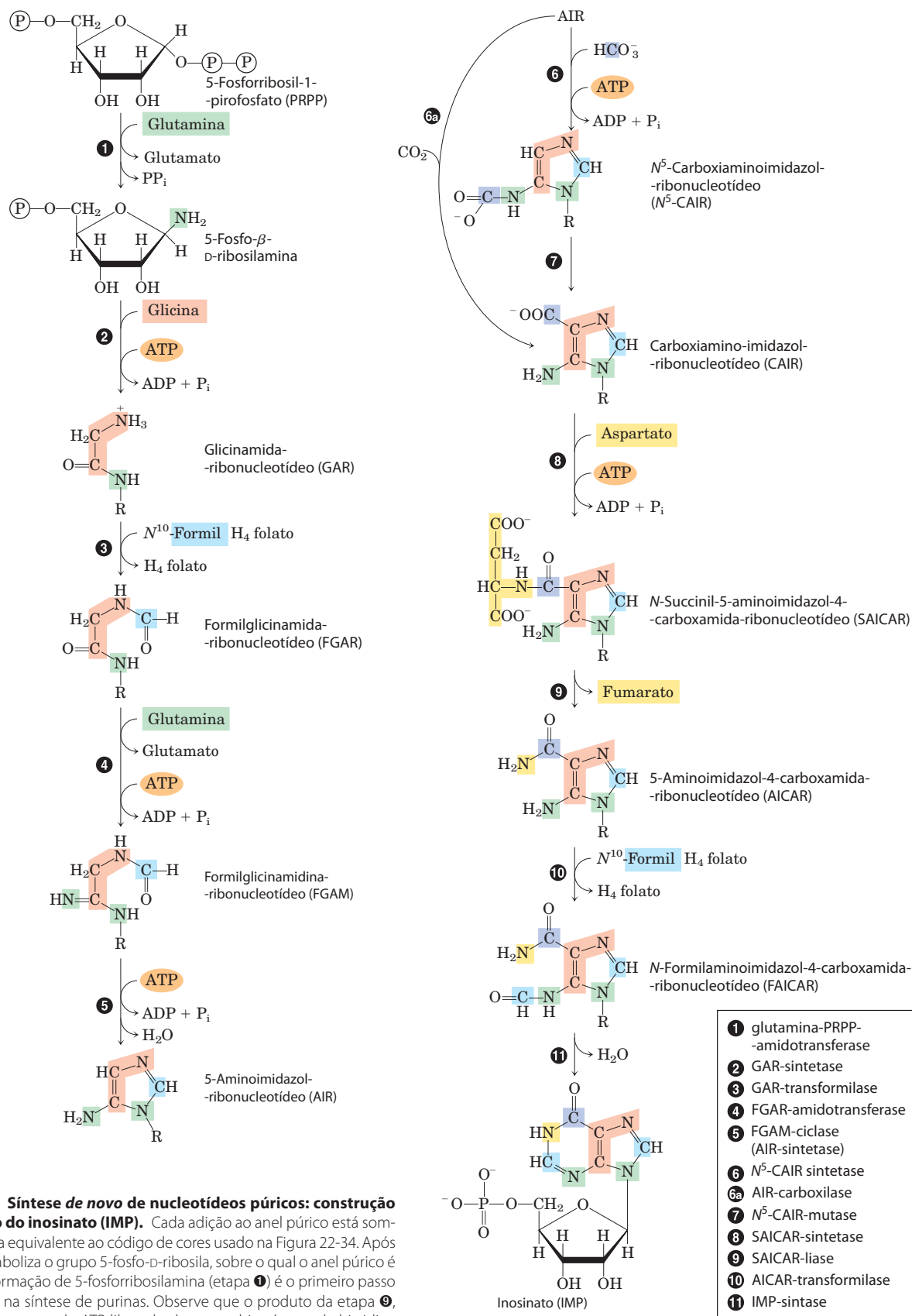



**FIGURA 22-35 Síntese *de novo* de nucleotídeos púricos: construção do anel púrico do inosinato (IMP).** Cada adição ao anel púrico está sombreada de forma equivalente ao código de cores usado na Figura 22-34. Após a etapa ❷, R simboliza o grupo 5-fosfo-D-ribosila, sobre o qual o anel púrico é construído. A formação de 5-fosforribosilamina (etapa ❶) é o primeiro passo comprometido na síntese de purinas. Observe que o produto da etapa ❾, AICAR, é remanescente do ATP liberado durante a biossíntese de histidina (ver Figura 22-22, etapa ❺). As abreviações são fornecidas para a maioria dos intermediários, para simplificar a designação das enzimas. A etapa 6a é uma via alternativa do AIR ao CAIR, que ocorre em eucariotos superiores.

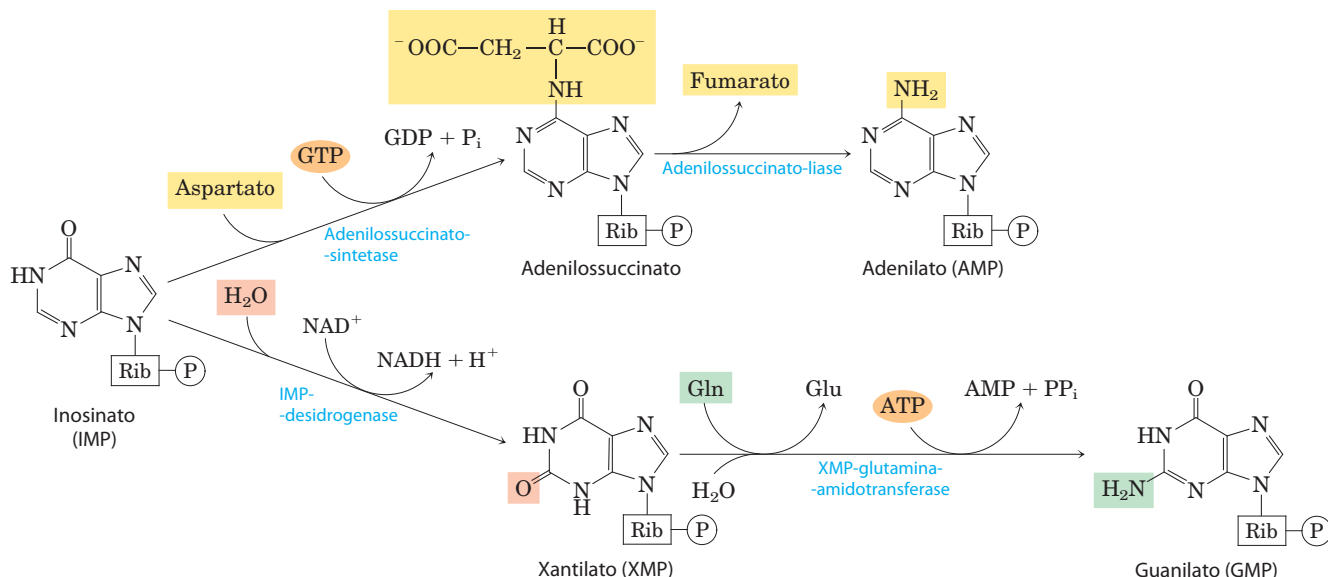



**FIGURA 22-36 Biossíntese de AMP e GMP a partir de IMP.**

lente. É provável que a canalização dos intermediários das reações de uma enzima até a seguinte, permitida por esses complexos, seja especialmente importante no caso de intermediários instáveis, como a 5-fosforribosilamina.

A conversão de inosinato em adenilato requer a inserção de um grupo amino derivado do aspartato (**Figura 22-36**); isso ocorre por meio de duas reações semelhantes àquelas utilizadas para introduzir o N-1 do anel púrico (Figura 22-35, etapas ❽ e ❾). Uma diferença crucial é que o GTP, e não o ATP, é a fonte do fosfato de alta energia para a síntese de adenilossuccinato. O guanilato é produzido pela oxidação dependente de $NAD^+$ no C-2 do inosinato, seguindo-se a adição de um grupo amino derivado da glutamina. Na etapa final, um ATP é clivado em AMP e $PP_i$ (Figura 22-36).

## A biossíntese de nucleotídeos púricos é regulada por retroalimentação negativa

Três principais mecanismos de retroalimentação cooperam na regulação da velocidade geral da síntese *de novo* de nucleotídeos púricos e das velocidades relativas de formação dos dois produtos finais, adenilato e guanilato (**Figura 22-37**). O primeiro mecanismo é exercido sobre a primeira reação que é exclusiva da síntese de purinas: a transferência de um grupo amino para o PRPP para formar 5-fosforribosilamina. Essa reação é catalisada pela enzima alostérica glutamina-PRPP-amidotransferase, que é inibida pelos produtos finais IMP, AMP e GMP. O AMP e o GMP atuam sinergicamente nessa inibição concertada. Assim, sempre que AMP ou GMP acumulam-se e estão presentes em excesso, o primeiro passo de sua biossíntese a partir de PRPP é parcialmente inibido.

No segundo mecanismo de controle, exercido sobre um estágio posterior, um excesso de GMP na célula inibe a formação de xantilato a partir de inosinato, pela IMP-desidrogenase, sem afetar a formação de AMP. Por sua vez, um acúmulo de adenilato inibe a formação de adenilossuccinato pela adenilossuccinato-sintetase, sem afetar a biossíntese de GMP. Quando os dois produtos estão presentes em quantidades suficientes, o IMP acumula-se e inibe um passo anterior da via; essa estratégia reguladora é chamada **inibição sequencial por retroalimentação**. No terceiro mecanismo, o GTP é necessário para a conversão de IMP em AMP, enquanto o ATP é necessário para a conversão de

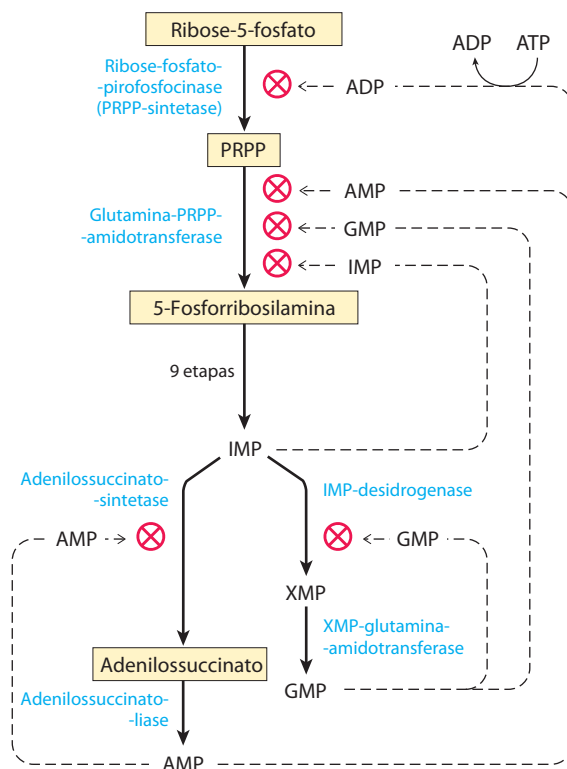



**FIGURA 22-37 Mecanismos reguladores na biossíntese de nucleotídeos da adenina e da guanina em *E. coli*.** A regulação dessas vias difere em outros organismos.

IMP em GMP (Figura 22-36), arranjo recíproco que tende a equilibrar a síntese dos dois ribonucleotídeos.

O último mecanismo de controle é a inibição da síntese de PRPP pela regulação alostérica da ribose-fosfato-pirofosfocinase. Essa enzima é inibida por ADP e GDP, além de metabólitos de outras vias para as quais o PRPP é o ponto de partida.

## Os nucleotídeos pirimídicos são sintetizados a partir de aspartato, PRPP e carbamoil-fosfato

Os ribonucleotídeos pirimídicos comuns são 5′-monofosfato de citidina (CMP; citidilato) e 5′-monofosfato de uridina (UMP; uridilato), os quais contêm as pirimidinas citosina e uracila. A biossíntese *de novo* dos nucleotídeos pirimídicos (**Figura 22-38**) ocorre de forma um pouco diferente em relação à síntese dos nucleotídeos púricos; o anel pirimídico de seis membros é sintetizado inicialmente, sendo então ligado à ribose-5-fosfato. Nesse processo, é necessário o carbamoil-fosfato, que também é intermediário no ciclo da ureia. Contudo, como observado no Capítulo 18, nos animais o carbamoil-fosfato necessário para a síntese de ureia é produzido na mitocôndria pela carbamoil-fosfato-sintetase I, ao passo que o carbamoil-fosfato necessário para a biossíntese de pirimidinas é produzido no citosol, por uma forma diferente da enzima, a **carbamoil-fosfato-sintetase II**. Nas bactérias, uma única enzima fornece o carbamoil-fosfato para a síntese de arginina e pirimidinas. A enzima bacteriana tem três sítios ativos separados, espaçados ao longo de um canal de aproximadamente 100 Å de comprimento (**Figura 22-39**). A carbamoil-fosfato-sintetase bacteriana fornece uma vívida ilustração da canalização de intermediários reacionais instáveis entre sítios ativos.

O carbamoil-fosfato reage com o aspartato, produzindo *N*-carbamoil-aspartato, no primeiro passo comprometido com a biossíntese de pirimidinas (Figura 22-38). Essa reação é catalisada pela **aspartato-transcarbamoilase**. Nas bactérias, esse passo é altamente regulado, e a aspartato-transcarbamoilase bacteriana é uma das enzimas alostéricas mais bem estudadas (ver a seguir). Pela remoção de água do *N*-carbamoil-aspartato, uma reação catalisada pela **di-hidro-orotase**, o anel pirimídico é fechado, formando L-di-hidro-orotato. Esse composto é oxidado, produzindo o derivado pirimídico orotato, reação na qual $NAD^+$ é o aceptor final de elétrons. Nos eucariotos, as primeiras três enzimas dessa via – carbamoil-fosfato-sintetase II, aspartato-transcarbamoilase e di-hidro-orotase – são parte de uma única proteína trifuncional. A proteína, conhecida pelo acrônimo CAD, contém três cadeias polipeptídicas idênticas (cada qual com $M_r$ 230.000), cada uma delas com sítios ativos para todas as três reações. Isso sugere que grandes complexos multienzimáticos possam ser a regra nessa via.

Uma vez que o orotato esteja formado, a cadeia lateral de ribose-5-fosfato, fornecida mais uma vez pelo PRPP, é ligada, produzindo orotidilato (Figura 22-38). O orotidilato é então descarboxilado, originando uridilato, que é fosforilado até UTP. O CTP é formado a partir do UTP pela ação da **citidilato-sintetase**, com formação de um intermediário acil-fosfato (consumindo um ATP). O doador de nitrogênio

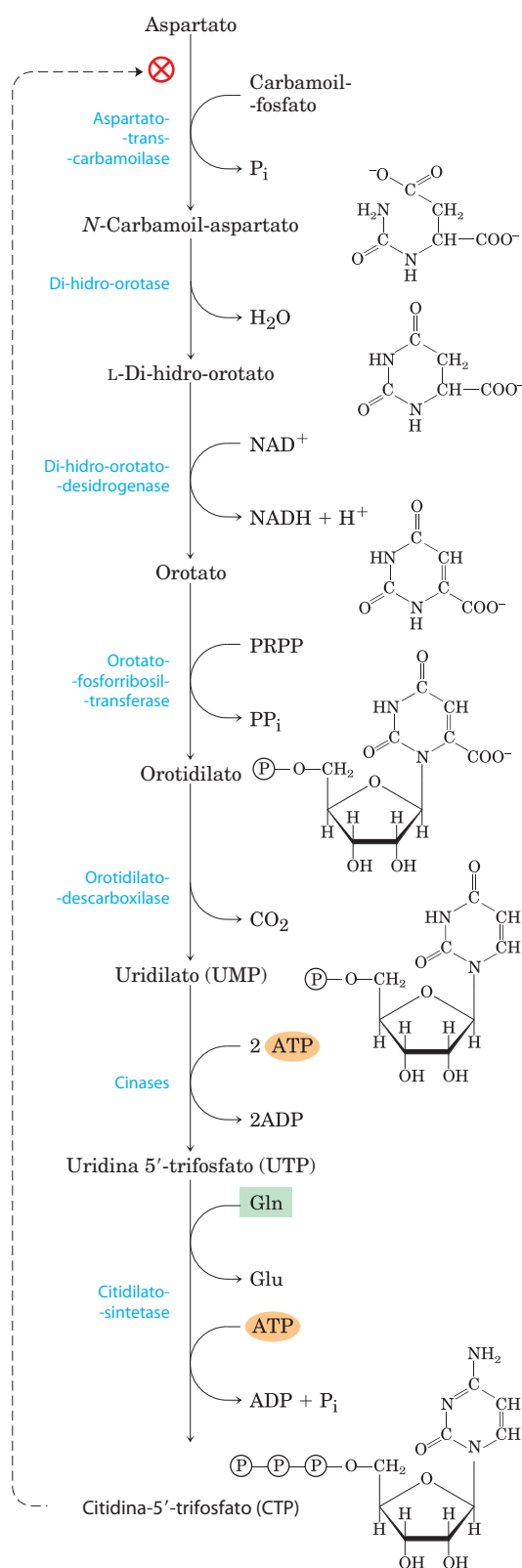



**FIGURA 22-38 Síntese *de novo* de nucleotídeos pirimídicos: biossíntese de UTP e CTP via orotidilato.** As pirimidinas são construídas a partir de carbamoil-fosfato e aspartato. A ribose-5-fosfato é então adicionada ao anel pirimídico completo pela orotato-fosforribosil-transferase. O primeiro passo dessa via (não mostrado aqui; ver Figura 18-11a) é a síntese de carbamoil-fosfato a partir de $CO_2$ e $NH_4^+$, catalisada, nos eucariotos, pela carbamoil-fosfato-sintetase II.

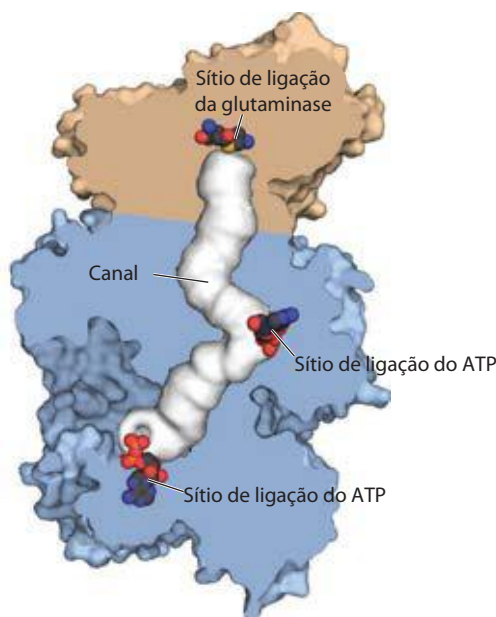



**FIGURA 22-39 Canalização de intermediários na carbamoil-fosfato--sintetase bacteriana.** (Derivado de PDB ID 1M6V) A reação catalisada por essa enzima (e por sua contraparte mitocondrial) está ilustrada na Figura 18-11a. A subunidade pequena e a grande são mostradas em bege escuro e azul, respectivamente. O canal entre os sítios ativos (quase 100 Å de comprimento) é representado em branco. Uma molécula de glutamina liga-se à subunidade menor, doando seu nitrogênio amídico como $NH_4^+$, em uma reação do tipo glutamina-amidotransferase. O $NH_4^+$ entra no canal, que o conduz a um segundo sítio ativo, onde ele se combina com bicarbonato, em uma reação que requer ATP. O carbamato então retorna ao canal, para alcançar o terceiro sítio ativo, onde é fosforilado a carbamoil-fosfato usando ATP. Para a determinação desta estrutura, a enzima foi cristalizada com a ornitina ligada ao sítio de ligação da glutamina e ADP ligado aos sítios de ligação do ATP.

normalmente é a glutamina, embora citidilato-sintetases de muitas espécies possam utilizar diretamente o $NH_4^+$.

## A biossíntese de nucleotídeos pirimídicos é regulada por retroalimentação negativa

A regulação da velocidade de síntese de nucleotídeos pirimídicos em bactérias ocorre, em grande parte, sobre a ação da aspartato-transcarbamoilase (ATCase), que catalisa a primeira reação da sequência e é inibida pelo CTP, o produto final da sequência (Figura 22-38). A molécula de ATCase bacteriana consiste em seis subunidades catalíticas e seis subunidades reguladoras (ver Figura 6-33). As subunidades catalíticas ligam as moléculas de substrato, e as subunidades alostéricas ligam o inibidor alostérico, o CTP. A molécula de ATCase completa, assim como suas subunidades, existe em duas conformações, ativa e inativa. Quando o CTP não estiver ligado às subunidades reguladoras, a enzima apresenta atividade máxima. À medida que o CTP se acumula e se liga às subunidades reguladoras, estas sofrem uma mudança em sua conformação. Essa mudança é transmitida às subunidades catalíticas, que então mudam para uma conformação inativa. O ATP impede essas mudanças induzidas pelo CTP. A **Figura 22-40** mostra os efeitos de reguladores alostéricos sobre a atividade da ATCase.

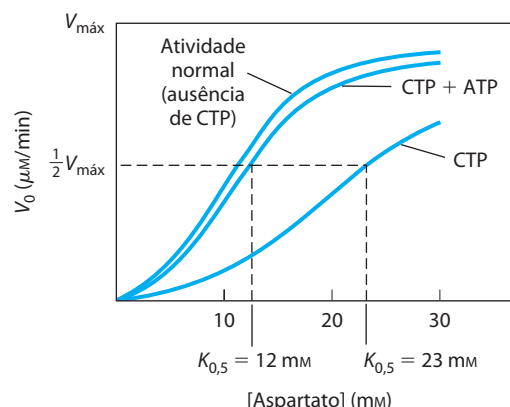



**FIGURA 22-40 Regulação alostérica da aspartato-transcarbamoilase por CTP e ATP.** A adição de CTP, inibidor alostérico da ATCase, em uma concentração de 0,8 mM, aumenta o $K_{0,5}$ para o aspartato (curva inferior), reduzindo a velocidade de conversão de aspartato em *N*-carbamoil-aspartato. ATP, na concentração de 0,6 mM, reverte completamente esse efeito inibitório (curva do meio).

## Nucleosídeos monofosfatados são convertidos em nucleosídeos trifosfatados

Nucleotídeos a serem utilizados em vias biossintéticas geralmente são convertidos em nucleosídeos trifosfatados. As vias de conversão são comuns a todas as células. A fosforilação de AMP em ADP é promovida pela **adenilato-cinase**, na reação

$$\text{ATP} + \text{AMP} \rightleftharpoons 2\ \text{ADP}$$

O ADP assim formado é fosforilado, produzindo ATP, pelas enzimas glicolíticas ou por meio da fosforilação oxidativa.

O ATP também participa da formação dos demais nucleosídeos difosfatados, pela ação de uma classe de enzimas chamadas de **nucleosídeo-monofosfato-cinases**. Essas enzimas, geralmente específicas para determinada base e não específicas para o açúcar (ribose ou desoxirribose), catalisam a reação

$$\text{ATP} + \text{NMP} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{NDP}$$

Os eficientes sistemas celulares que fosforilam novamente o ADP a ATP tendem a impulsionar essa reação no sentido dos produtos.

Os nucleosídeos difosfatados são convertidos nos seus equivalentes trifosfatados pela ação de uma enzima ubíqua, **nucleosídeo-difosfato-cinase**, que catalisa a reação

$$\text{NTP}_D + \text{NDP}_A \rightleftharpoons \text{NDP}_D + \text{NTP}_A$$

Essa enzima é notável pelo fato de não ser específica para a base (purinas ou pirimidinas) ou para o açúcar (ribose ou desoxirribose). Essa não especificidade aplica-se tanto ao aceptor do fosfato (A) quanto ao doador (D), embora o doador ($\text{NTP}_D$) seja quase invariavelmente o ATP, pois está presente em maiores concentrações que outros nucleosídeos trifosfatados em condições aeróbias.

## Os ribonucleotídeos são precursores dos desoxirribonucleotídeos

Os desoxirribonucleotídeos, os blocos constitutivos do DNA, são produzidos a partir dos ribonucleotídeos correspondentes, por redução direta do átomo de carbono 2′ da D-ribose, formando o derivado 2′-desóxi. Por exemplo, o difosfato de adenosina (ADP) é reduzido a difosfato de 2′-desoxiadenosina (dADP) e o GDP é reduzido a dGDP. Essa reação é, de certo modo, incomum, pelo fato de que a redução ocorre em um carbono não ativado; não são conhecidas reações químicas análogas muito próximas. A reação é catalisada pela **ribonucleotídeo-redutase**, melhor caracterizada em *E. coli*, cujos substratos são ribonucleosídeos difosfatados.

A redução da porção D-ribose de um ribonucleosídeo difosfatado em 2′-desóxi-D-ribose requer um par de átomos de hidrogênio, que são doados, em última análise, pelo NADPH, via uma proteína carreadora de hidrogênios intermediária, a **tiorredoxina**. Essa proteína ubíqua tem uma função redox semelhante na fotossíntese (ver Figura 20-19) e em outros processos. A tiorredoxina tem pares de grupos —SH, que carregam átomos de hidrogênio do NADPH até o ribonucleosídeo difosfatado. Sua forma oxidada (dissulfeto) é reduzida pelo NADPH em uma reação catalisada pela **tiorredoxina-redutase** (**Figura 22-41**), e a tiorredoxina reduzida é então utilizada pela ribonucleotídeo-redutase para reduzir nucleosídeos difosfatados (NDP), produzindo desoxirribonucleosídeos difosfatados (dNDP). Uma segunda fonte de equivalentes redutores para a ribonucleotídeo-redutase é a glutationa (GSH). A glutationa serve como agente redutor para uma proteína semelhante à tiorredoxina, a **glutarredoxina**, que então transfere poder redutor à ribonucleotídeo-redutase (Figura 22-41).

**FIGURA 22-41 Redução de ribonucleotídeos a desoxirribonucleotídeos pela ribonucleotídeo-redutase.** Os elétrons são transmitidos (setas vermelhas) para a enzima a partir do NADPH, via **(a)** glutarredoxina ou **(b)** tiorredoxina. Os grupos sulfeto na glutarredoxina-redutase são fornecidos por duas moléculas de glutationa ligada (GSH; GSSG indica a glutationa oxidada). Observe que a tiorredoxina-redutase é uma flavoenzima, com FAD como grupo prostético.

A ribonucleotídeo-redutase é notável por seu mecanismo de reação, que fornece o exemplo melhor caracterizado de algo que se acreditava ser raro nos sistemas biológicos, o envolvimento de radicais livres em transformações bioquímicas. A enzima da *E. coli* e da maioria dos eucariotos é um dímero $\alpha_2\beta_2$, com as subunidades $\alpha_2$ catalíticas e as subunidades $\beta_2$ funcionando como geradores de radicais livres (**Figura 22-42**). Cada subunidade catalítica contém dois tipos de sítios reguladores, como descrito a seguir. Os

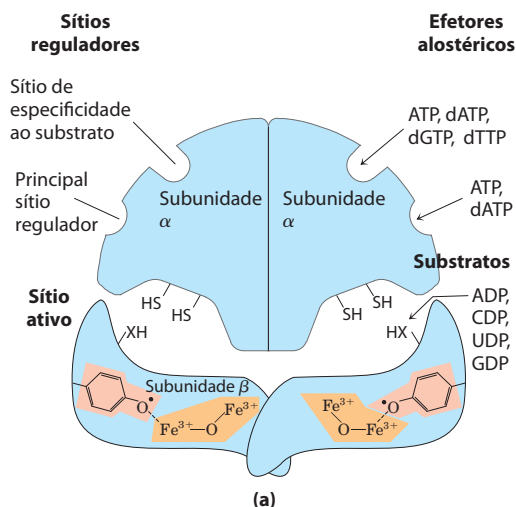
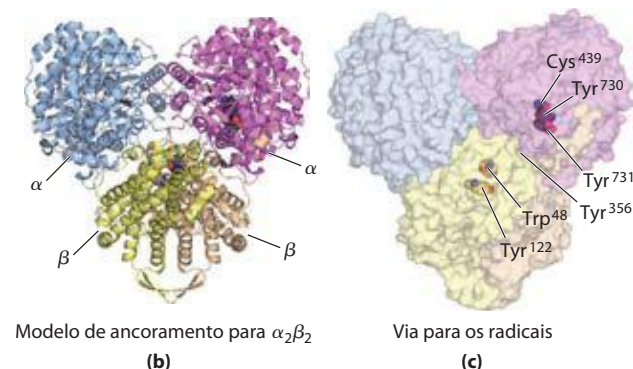
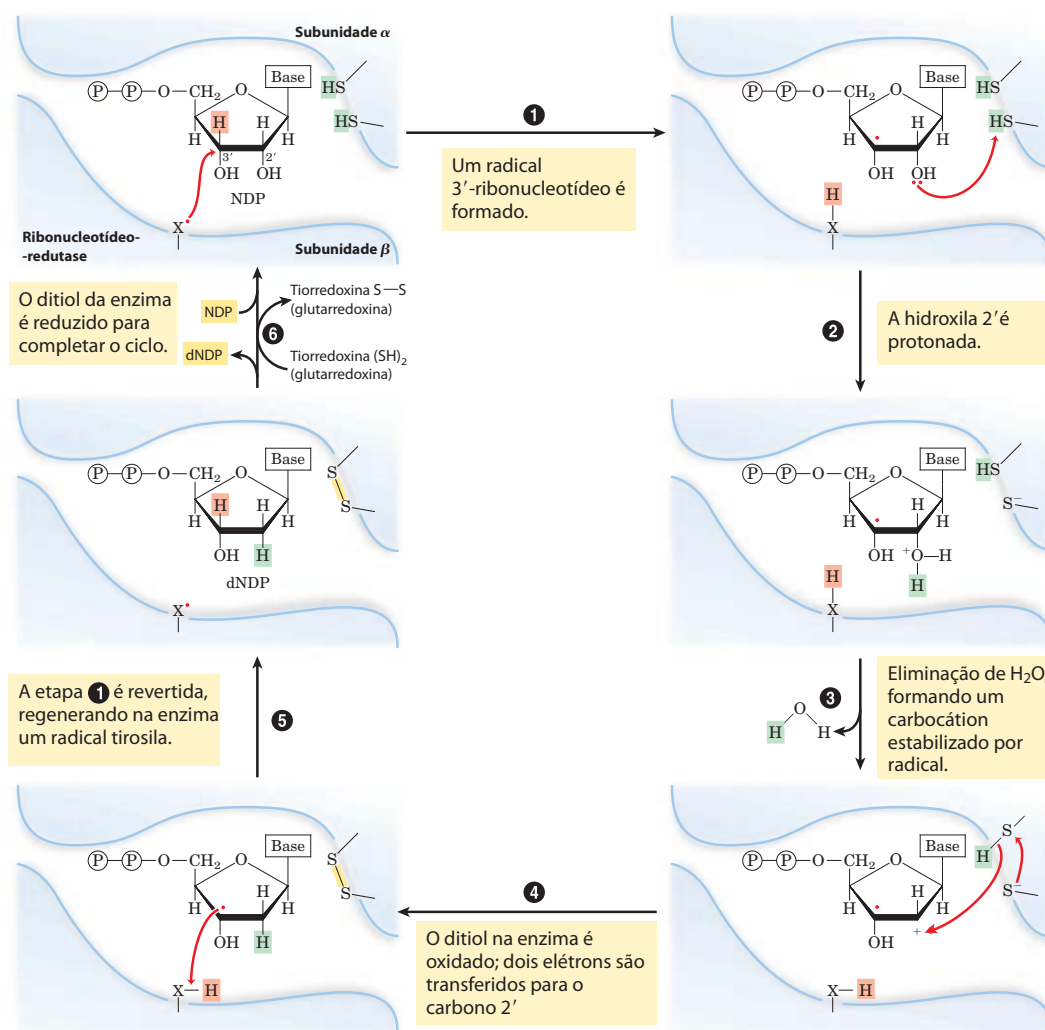



**FIGURA 22-42 Ribonucleotídeo-redutase. (a)** Um diagrama esquemático das estruturas das subunidades. A subunidade catalítica ($\alpha$; também chamada R1) contém os dois sítios reguladores descritos na Figura 22-44 e dois resíduos de Cys centrais para o mecanismo de reação. As subunidades $\beta$ (também chamadas R2), geradoras de radicais livres, contêm o resíduo de $Tyr^{122}$ crítico e o centro com o ferro binuclear. **(b)** As estruturas de $\alpha_2$ e $\beta_2$ originam a estrutura provável de $\alpha_2\beta_2$ (derivada de PDB ID 3UUS). **(c)** Via provável para a formação de radical desde a $Tyr^{122}$ inicial em uma subunidade $\beta$ até a $Cys^{439}$ do sítio ativo, usada no mecanismo da reação mostrado na Figura 22-43. Diversos resíduos de aminoácidos aromáticos participam em uma transferência de radicais de longo alcance, desde o ponto de sua formação na $Tyr^{122}$ até o sítio ativo, onde o nucleotídeo substrato está ligado.

dois sítios ativos da enzima formam-se na interface entre as subunidades catalíticas ($\alpha_2$) e geradoras de radicais livres ($\beta_2$). Em cada sítio ativo, a subunidade $\alpha$ contribui com dois grupos sulfidrila, necessários para a atividade, e as subunidades $\beta_2$ contribuem com um radical tirosila estável. As subunidades $\beta_2$ também apresentam um cofator ferro binuclear ($Fe^{3+}$), que ajuda a gerar e a estabilizar o radical $Tyr^{122}$ (Figura 22-42). O radical tirosila está muito distante do sítio ativo para interagir diretamente com o sítio, mas diversos resíduos aromáticos formam uma via de longo alcance de transferência de radicais até o sítio ativo (Figura 22-42c). Um mecanismo provável para a reação da ribonucleotídeo-redutase está ilustrado na **Figura 22-43**. Na *E. coli*, fontes prováveis dos equivalentes redutores necessários para essa reação são a tiorredoxina e a glutarredoxina, como observado anteriormente.

Três classes de ribonucleotídeo-redutases foram descritas. Seus mecanismos (quando conhecidos) geralmente estão de acordo com o esquema na Figura 22-43, mas essas reações diferem quanto à identidade do grupo que fornece o radical no sítio ativo e quanto aos cofatores utilizados para gerá-lo. A enzima da *E. coli* (classe I) requer oxigênio para regenerar o radical tiroxila, se ele estiver inativado, de modo que essa enzima somente funciona em um ambiente aeróbio. Enzimas de classe II, encontradas em outros microrganismos, apresentam 5′-desoxiadenosilcobalamina (ver Quadro 17-2) em vez de um centro de ferro binuclear. Enzimas de classe III evoluíram para atuar em ambientes anaeróbios. A *E. coli* contém, quando cresce anaerobiamente, uma ribonucleotídeo-redutase adicional, de classe III; essa enzima contém um centro de ferro-enxofre (estruturalmente distinto do centro binuclear de ferro da enzima de classe I) e requer NADPH e *S*-adenosilmetionina para sua atividade. Ela utiliza como substratos nucleosídeos trifosfatados em vez de nucleosídeos difosfatados. A evolução das diferentes classes de ribonucleotídeo-redutases para a produção de precursores do DNA em diferentes ambientes reflete a importância dessa reação no metabolismo dos nucleotídeos.

A regulação da ribonucleotídeo-redutase da *E. coli* é incomum pelo fato de que não apenas sua *atividade*, mas sua *especificidade quanto ao substrato* é regulada pela ligação de moléculas efetoras. Cada subunidade $\alpha$ contém dois

**MECANISMO – FIGURA 22-43 Mecanismo proposto para a ribonucleotídeo-redutase.** Na enzima de *E. coli* e na maioria dos eucariotos, os grupos tiol ativos estão na subunidade $\alpha$. O radical no sítio ativo (—X•) está na subunidade $\beta$ e, na *E. coli*, provavelmente seja um radical tiila da $Cys^{439}$ (ver Figura 22-42).

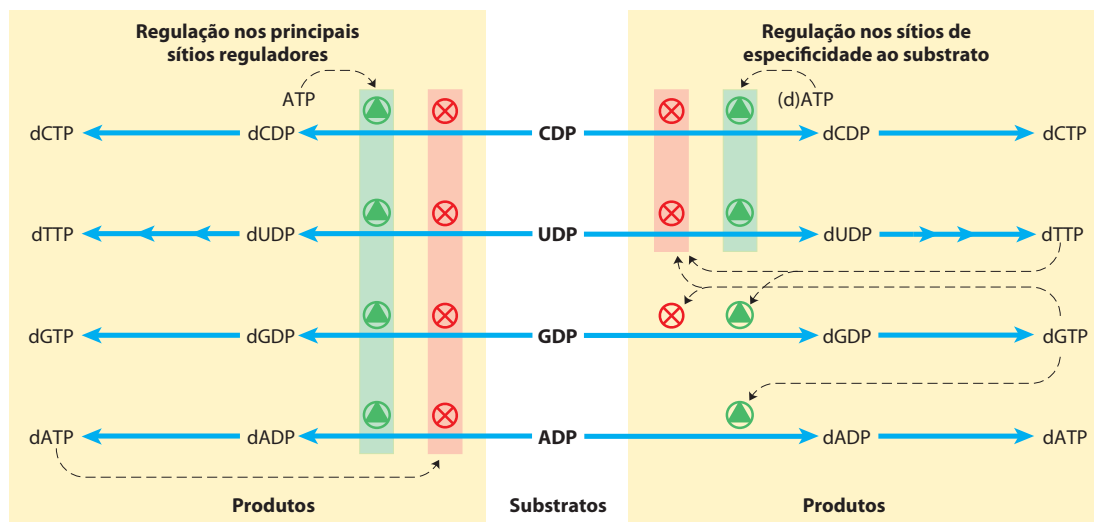



**FIGURA 22-44 Regulação da ribonucleotídeo-redutase por desoxinucleosídeos trifosfatados.** A atividade geral da enzima é afetada pela ligação de efetores ao principal sítio regulador (à esquerda). A especificidade da enzima ao substrato é afetada pela natureza da molécula efetora ligada ao segundo tipo de sítio regulador, o sítio de especificidade ao substrato (à direita). O diagrama indica inibição ou estimulação da atividade enzimática para os quatro diferentes substratos. A via desde o dUDP até o dTTP é descrita posteriormente (ver Figuras 22-46, 22-47).

tipos de sítios reguladores (Figura 22-42). Um tipo afeta a atividade geral da enzima e liga ou ATP, que ativa a enzima, ou dATP, que a inativa. O segundo tipo determina uma alteração na especificidade quanto ao substrato em resposta à molécula efetora – ATP, dATP, dTTP ou dGTP – que ali se liga (**Figura 22-44**). Quando ATP ou dATP está ligado, a redução de UDP e CDP é favorecida. Quando dTTP ou dGTP está ligado, a redução de GDP ou ADP, respectivamente, é estimulada. O esquema é projetado para fornecer um conjunto equilibrado de precursores para a síntese de DNA. O ATP também é um ativador geral para a biossíntese e a redução de ribonucleotídeos. A presença de dATP em pequenas quantidades aumenta a redução de nucleotídeos pirimídicos. Um suprimento excessivo de dNTP pirimídico é sinalizado por altos níveis de dTTP, que altera a especificidade em favor da redução de GDP. Níveis elevados de dGTP, por sua vez, deslocam a especificidade para a redução do ADP, e altos níveis de dATP inativam a enzima. Acredita-se que esses efetores induzam diversas conformações enzimáticas distintas, com diferentes especificidades.

Esses efeitos regulatórios são acompanhados e, possivelmente, mediados por grandes rearranjos estruturais na enzima. Quando a forma ativa da enzima de *E. coli* ($\alpha_2\beta_2$) é inibida pela adição do inibidor alostérico dATP, forma-se uma estrutura em anel $\alpha_4\beta_4$, com subunidades $\alpha_2$ e $\beta_2$ alternadas (**Figura 22-45**). Nessa estrutura alterada, a via de formação de radicais de $\beta$ para $\alpha$ é prejudicada, e os resíduos no caminho ficam expostos ao solvente, de modo que é efetivamente impedida a transferência de radicais, inibindo assim a reação. A formação das estruturas em anel $\alpha_4\beta_4$ é revertida quando os níveis de dATP são reduzidos. A ribonucleotídeo-redutase de leveduras também sofre oligomerização na presença de dATP, formando uma estrutura hexamérica em anel, $\alpha_6\beta_6$.

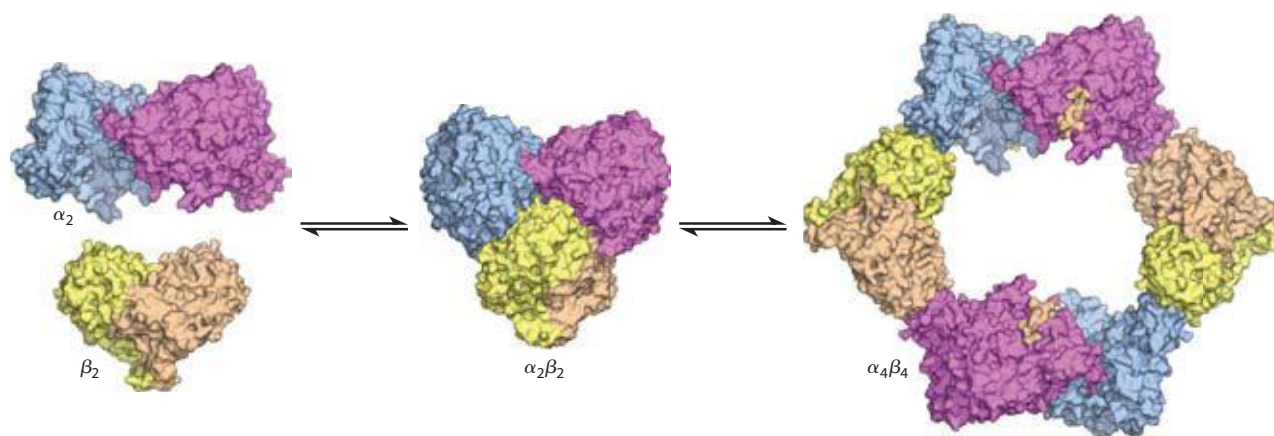



**FIGURA 22-45 Oligomerização da ribonucleotídeo-redutase induzida pelo inibidor alostérico dATP.** Em altas concentrações de dATP (50 $\mu$M), formam-se estruturas $\alpha_4\beta_4$ em forma de anel (PDB ID 3UUS). Nessa conformação, os resíduos da via formadora de radicais ficam expostos ao solvente, bloqueando a reação com o radical e inibindo a enzima. A oligomerização é revertida em baixas concentrações de dATP.

## O timidilato é derivado do dCDP e do dUMP

O DNA contém timina em vez de uracila, e a via *de novo* até a timina envolve apenas desoxirribonucleotídeos. O precursor imediato do timidilato (dTMP) é o dUMP. Em bactérias, a via para o dUMP inicia com a formação de dUTP, seja por desaminação de dCTP ou por fosforilação do dUDP (**Figura 22-46**). O dUTP é convertido em dUMP por uma dUTPase. Essa última reação deve ser eficiente para manter baixos níveis de dUTP, impedindo a incorporação de uridilato ao DNA.

A conversão de dUMP em dTMP é catalisada pela **timidilato-sintase**. Uma unidade de um carbono, no estado de oxidação de hidroximetila (—$CH_2OH$) (Figura 18-17), é transferida do $N^5$,$N^{10}$-metilenotetra-hidrofolato para o dUMP, e então reduzida até um grupo metila (**Figura 22-47**). A redução ocorre à custa da oxidação do tetra-hidrofolato em di-hidrofolato, que é incomum em reações que requerem tetraidrofolato. (O mecanismo dessa reação é mostrado na Figura 22-53.) O di-hidrofolato é reduzido a tetra-hidrofolato pela **di-hidrofolato-redutase** – regeneração essencial para muitos processos que requerem tetra-hidrofolato. Em plantas e em pelo menos um protista, a timidilato-sintase e a di-hidrofolato-redutase residem em uma única proteína bifuncional.

Cerca de 10% dos seres humanos (e até 50% das pessoas em comunidades pobres) sofrem de deficiência de ácido fólico. Quando a deficiência é grave, os sintomas podem incluir doença cardíaca, câncer e alguns tipos de distúrbios encefálicos. Pelo menos alguns desses sintomas surgem da redução da síntese de timidilato, levando a uma incorporação anormal de uracila no DNA. A uracila é reconhecida pelos sistemas de reparo do DNA (descritos no Capítulo 25) e é removida do DNA. A presença de altos níveis de uracila no DNA leva a quebras da fita, que podem afetar muito a função e a regulação do DNA nuclear, causando por fim os efeitos observados sobre o coração e o encéfalo, assim como aumento da mutagênese, que leva ao câncer. ■

**FIGURA 22-47 Conversão de dUMP em dTMP pelas enzimas timidilato-sintase e di-hidrofolato-redutase.** A serina-hidroximetil-transferase é necessária para a regeneração da forma $N^5$,$N^{10}$-metileno do tetra-hidrofolato. Na síntese do dTMP, todos os três hidrogênios do grupo metila adicionado são derivados do $N^5$,$N^{10}$-metilenotetra-hidrofolato (em cor salmão e cinza).

## A degradação de purinas e pirimidinas produz respectivamente ácido úrico e ureia

Os nucleotídeos púricos são degradados por uma via na qual eles perdem seu fosfato por meio da ação da **5′-nucleotidase** (**Figura 22-48**). O adenilato produz adenosina, que é desaminada pela **adenosina-desaminase**, gerando inosina, a qual é hidrolisada produzindo hipoxantina (sua base púrica) e D-ribose. A hipoxantina é sucessivamente oxidada a xantina e a ácido úrico pela **xantina-oxidase**, flavoenzima com um átomo de molibdênio e quatro centros de ferro-enxofre em seu grupo prostético. O oxigênio molecular é o aceptor de elétrons nessa complexa reação.

O catabolismo do GMP também produz ácido úrico como produto final. O GMP é inicialmente hidrolisado originando guanosina, a qual é então clivada, liberando guanina livre. A guanina sofre remoção hidrolítica de seu grupo amino, produzindo xantina, que é convertida em ácido úrico pela xantina-oxidase (Figura 22-48).

**FIGURA 22-46 Biossíntese de timidilato (dTMP).** As vias são mostradas iniciando com a reação catalisada pela ribonucleotídeo-redutase. A Figura 22-47 fornece detalhes da reação da timidilato-sintase.

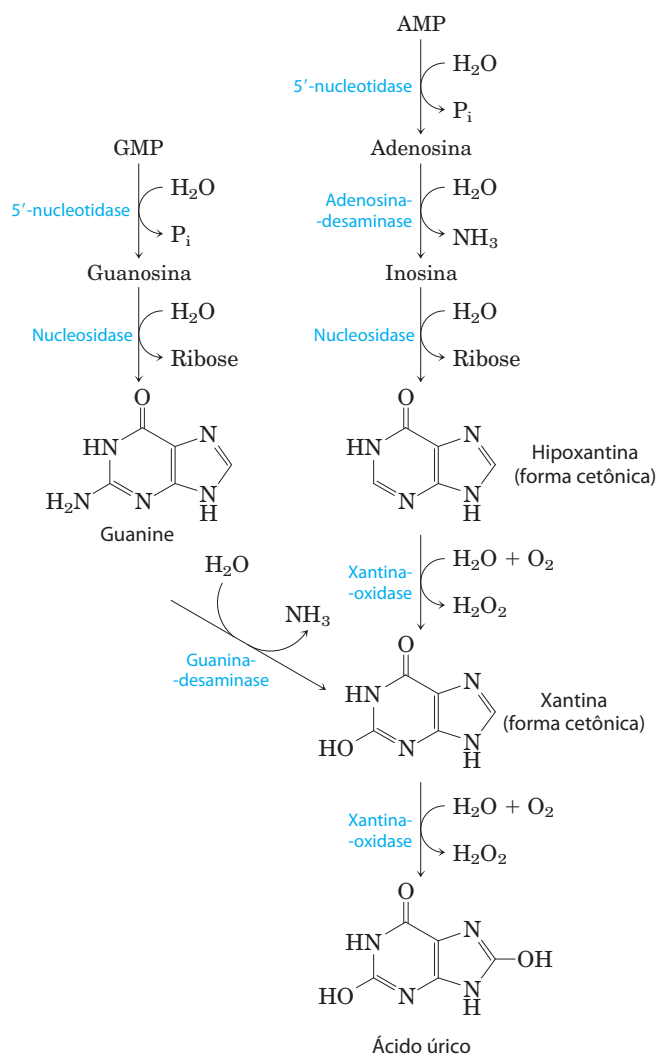



**FIGURA 22-48 Catabolismo dos nucleotídeos púricos.** Observe que os primatas excretam muito mais nitrogênio na forma de ureia, via ciclo da ureia (Capítulo 18), do que na forma de ácido úrico, produzido na degradação das purinas. Do mesmo modo, os peixes excretam muito mais nitrogênio em forma de $NH_4^+$ do que em forma de ureia, produzida na via aqui mostrada.

O ácido úrico é o produto final de excreção do catabolismo das purinas em primatas, aves e em alguns outros animais. Um adulto humano saudável excreta ácido úrico em uma taxa de cerca de 0,6 g/24 h; o produto excretado origina-se, em parte, das purinas ingeridas e, em parte, da renovação dos nucleotídeos púricos dos ácidos nucleicos. Na maioria dos mamíferos e em muitos outros vertebrados, o ácido úrico é ainda degradado até **alantoína** pela ação da **urato-oxidase**. Em outros organismos, a via continua ainda mais, como mostrado na Figura 22-48.

As vias para a degradação das pirimidinas geralmente levam à produção de $NH_4^+$ e, assim, à síntese de ureia. A timina, por exemplo, é degradada em semialdeído metilmalônico (**Figura 22-49**), intermediário do catabolismo da valina. Esse composto é então degradado, via propionil-CoA e metilmalonil-CoA, gerando, por fim, succinil-CoA (ver Figura 18-27).

Aberrações genéticas do metabolismo das purinas em humanos têm sido observadas, algumas com graves consequências. Por exemplo, a **deficiência de adenosina-desaminase** (**ADA**) leva a uma doença com grave imunodeficiência, na qual os linfócitos T e B não se desenvolvem adequadamente. A falta de ADA leva a um aumento de 100 vezes nas concentrações celulares de dATP, um poderoso inibidor da ribonucleotídeo-redutase (Figura 22-44). Altos níveis de dATP produzem uma deficiência geral de outros dNTP nos linfócitos T. A base para a toxicidade para os linfócitos B está menos esclarecida. Pessoas com deficiência de ADA não possuem um sistema imune efetivo e não sobrevivem, a não ser isolados no ambiente de uma "bolha"

Timina

Di-hidrouracil-desidrogenase — NADPH + $H^+$ → $NADP^+$

Di-hidrotimina

Di-hidropirimidinase — $H_2O$

$\beta$-Ureidoisobutirato

$\beta$-ureidopropionase — $H_2O$ → $NH_4^+$ + $HCO_3^-$

$\beta$-Aminoisobutirato

Aminotransferase — $\alpha$-Cetoglutarato → Glutamato

Semialdeído metilmalônico

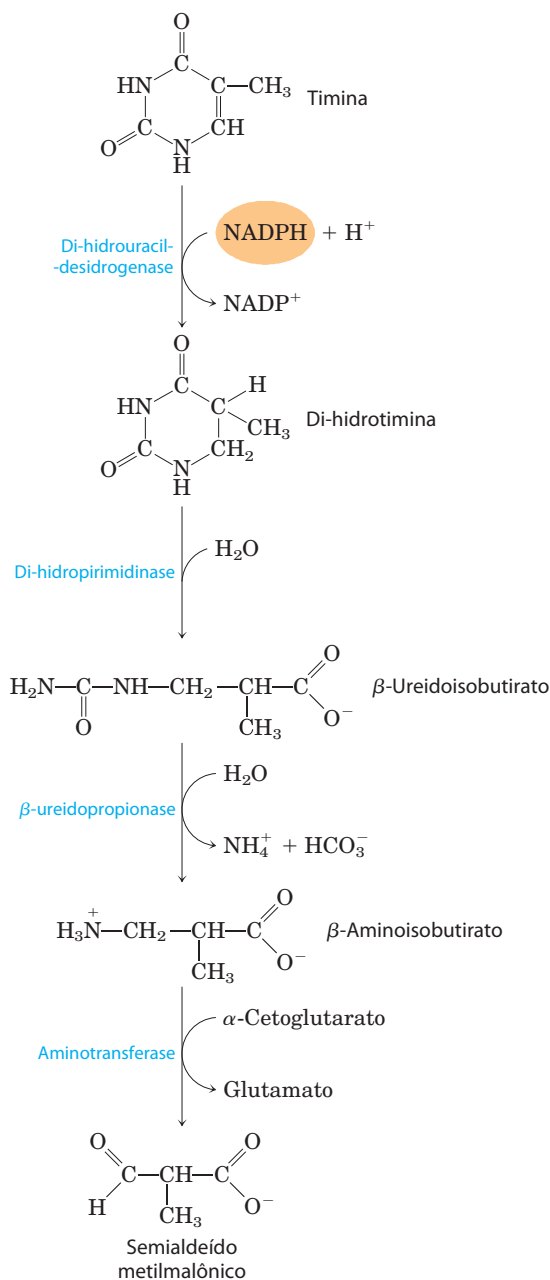
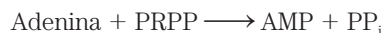



**FIGURA 22-49 Catabolismo de uma pirimidina.** Aqui está mostrada a via do catabolismo da timina. O semialdeído metilmalônico é posteriormente degradado a succinil-CoA.

estéril. A deficiência de ADA foi um dos primeiros alvos das tentativas de terapia gênica em humanos (em 1990), que produziram resultados conflitantes. Em tentativas mais recentes, alguns indivíduos com deficiência de ADA conseguiram obter função imunitária normal após receberem um gene funcional para a ADA. ■

## Bases púricas e pirimídicas são recicladas por vias de salvação

As bases púricas e pirimídicas livres são constantemente liberadas nas células durante a degradação metabólica dos nucleotídeos. As purinas livres são, em grande parte, salvas e reutilizadas para sintetizar nucleotídeos, em uma via muito mais simples que a síntese *de novo* dos nucleotídeos púricos, descrita anteriormente. Uma das principais vias de salvação consiste em uma única reação, catalisada pela **adenosina-fosforribosil-transferase**, na qual adenina livre reage com PRPP para produzir o correspondente nucleotídeo da adenina:

$$\text{Adenina} + \text{PRPP} \longrightarrow \text{AMP} + \text{PP}_i$$

Guanina e hipoxantina (produto da desaminação da adenina; Figura 22-48) livres são salvas por essa mesma via, pela **hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase**. Existe uma via de salvação semelhante para bases pirimídicas em microrganismos e, possivelmente, em mamíferos.

Um defeito genético na atividade da hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase, observado quase exclusivamente em crianças do sexo masculino, resulta no conjunto de sintomas denominado **síndrome de Lesch-Nyhan**. Crianças com essa doença genética, que se manifesta em torno dos dois anos, apresentam, algumas vezes, baixa coordenação motora e deficiência intelectual. Além disso, são extremamente agressivas e mostram tendências à compulsão autodestrutiva: apresentam automutilação, mordendo dedos, artelhos e lábios.

Os efeitos devastadores da síndrome de Lesch-Nyhan ilustram a importância das vias de salvação. Hipoxantina e guanina surgem constantemente da degradação dos ácidos nucleicos. Na ausência da hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase, os níveis de PRPP aumentam e ocorre uma superprodução de purinas pela via *de novo*, resultando na produção de altos níveis de ácido úrico e lesão tecidual semelhante à da gota (ver a seguir). O cérebro é especialmente dependente das vias de salvação e isso pode ser a causa da lesão do sistema nervoso em crianças com síndrome de Lesch-Nyhan. Essa síndrome é outro alvo potencial para a terapia gênica. ■

## Excesso de ácido úrico causa gota

Durante muito tempo, acreditou-se erroneamente que a gota fosse devida a um "estilo de vida elevado". A gota é uma doença das articulações, causada pela concentração elevada de ácido úrico no sangue e nos tecidos. As articulações tornam-se inflamadas, doloridas e artríticas devido à deposição anormal de cristais de urato de sódio. Os rins também são afetados, pois ácido úrico em excesso se deposita nos túbulos renais. A gota ocorre predominantemente em pessoas do sexo masculino. Sua causa precisa não é conhecida, mas frequentemente envolve uma excreção reduzida de uratos. A deficiência genética de alguma enzima do metabolismo das purinas também pode ser um fator em alguns casos.

A gota pode ser tratada de maneira eficiente por uma combinação de terapias nutricionais e farmacológicas. Alimentos especialmente ricos em nucleotídeos e ácidos nucleicos, como fígado ou produtos glandulares, devem ser removidos da dieta. Um grande alívio dos sintomas pode ser obtido pela administração de **alopurinol** (**Figura 22-50**), que inibe a xantina-oxidase, a enzima que catalisa a conversão de purinas em ácido úrico. O alopurinol é um substrato da xan-

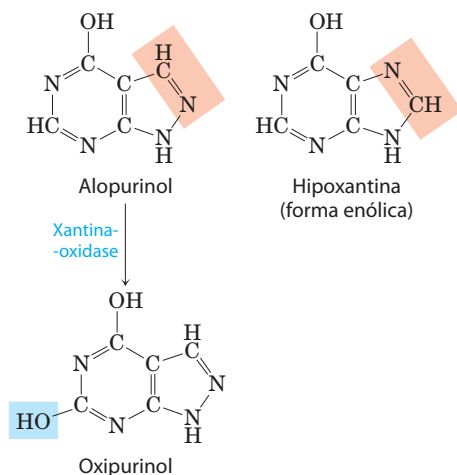



**FIGURA 22-50 Alopurinol, inibidor da xantina-oxidase.** A hipoxantina é o substrato normal da xantina-oxidase. Apenas uma leve alteração na estrutura da hipoxantina (sombreada em cor salmão) produz um inibidor enzimático clinicamente efetivo, o alopurinol. No sítio ativo, o alopurinol é convertido em oxipurinol, um forte inibidor competitivo, que permanece firmemente ligado à forma reduzida da enzima.

tina-oxidase, que o converte em oxipurinol (aloxantina). O oxipurinol inativa a forma reduzida da enzima permanecendo fortemente ligado ao seu sítio ativo. Quando a xantina-oxidase é inibida, os produtos de excreção do metabolismo das purinas são xantina e hipoxantina, que são mais hidrossolúveis que o ácido úrico e apresentam menor probabilidade de formar depósitos de cristais. O alopurinol foi desenvolvido por Gertrude Elion e George Hitchings, que também desenvolveram o aciclovir, usado no tratamento de pacientes com infecções orais ou genitais por herpes, e outros análogos das purinas utilizados na quimioterapia contra o câncer. ■

## Muitos agentes quimioterápicos têm como alvo enzimas das vias de biossíntese de nucleotídeos

 O crescimento de células cancerosas não é controlado da mesma forma que o crescimento das células na maioria dos tecidos normais. As células cancerosas apresentam maiores necessidades de nucleotídeos, como precursores de DNA e RNA e, em consequência, geralmente são mais sensíveis do que as células normais aos inibidores da biossíntese de nucleotídeos. Um conjunto crescente de agentes quimioterápicos importantes – para o câncer e para outras doenças – atua inibindo uma ou mais enzimas dessas vias. Serão descritos aqui diversos exemplos bem estudados que ilustram abordagens produtivas de tratamento e ajudam a compreender como essas enzimas funcionam.

Gertrude Elion (1918-1999) e George Hitchings (1905-1998)

O primeiro conjunto de agentes inclui compostos que inibem glutamina-amidotransferases. Lembre que a glutamina atua como doador de nitrogênio em pelo menos meia dúzia de reações isoladas da biossíntese de nucleotídeos. Os sítios de ligação para a glutamina e o mecanismo pelo qual o $NH_4^+$ é extraído são bastante semelhantes em muitas dessas enzimas. A maioria delas é fortemente inibida por análogos da glutamina, como **azasserina** e **acivicina** (**Figura 22-51**). A azasserina, caracterizada por John Buchanan na década de 1950, foi um dos primeiros exemplos de inativador enzimático com base no mecanismo da reação (inativador suicida; p. 210 e Quadro 6-3). A acivicina parece promissora como agente quimioterápico contra o câncer.

Outros alvos úteis para agentes farmacêuticos são a timidilato-sintase e a di-hidrofolato-redutase, enzimas que fornecem a única via celular para a síntese de timina (**Figura 22-52**). Inibidor que atua na síntese de timidilato, a **fluorouracila**, é um importante agente quimioterápico. A fluorouracila, por si só, não é um inibidor enzimático. Na célula, vias de salvação a convertem no desoxinucleosídeo monofosfatado FdUMP, que se liga à enzima, inativando-a. A inibição por FdUMP (**Figura 22-53**) é um exemplo clássico de inativação enzimática com base no mecanismo da reação. O **metotrexato**, outro exemplo importante de agente quimioterápico, é um inibidor da di-hidrofolato-redutase. Esse análogo do folato atua como inibidor competitivo; a enzima liga-se ao metotrexato com afinidade cerca de 100 vezes maior que ao di-hidrofolato. A **aminopterina** é um composto relacionado, que atua de forma semelhante.

O potencial clínico dos inibidores da biossíntese de nucleotídeos não está limitado ao tratamento do câncer. Todas as células de crescimento rápido (incluindo bactérias e

Glutamina

Azasserina

Acivicina

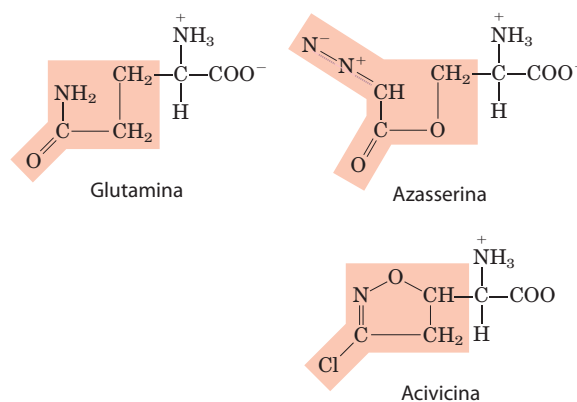



**FIGURA 22-51 Azasserina e acivicina, inibidores das glutamina-amidotransferases.** Esses análogos da glutamina interferem em diversas vias de biossíntese de aminoácidos e nucleotídeos.

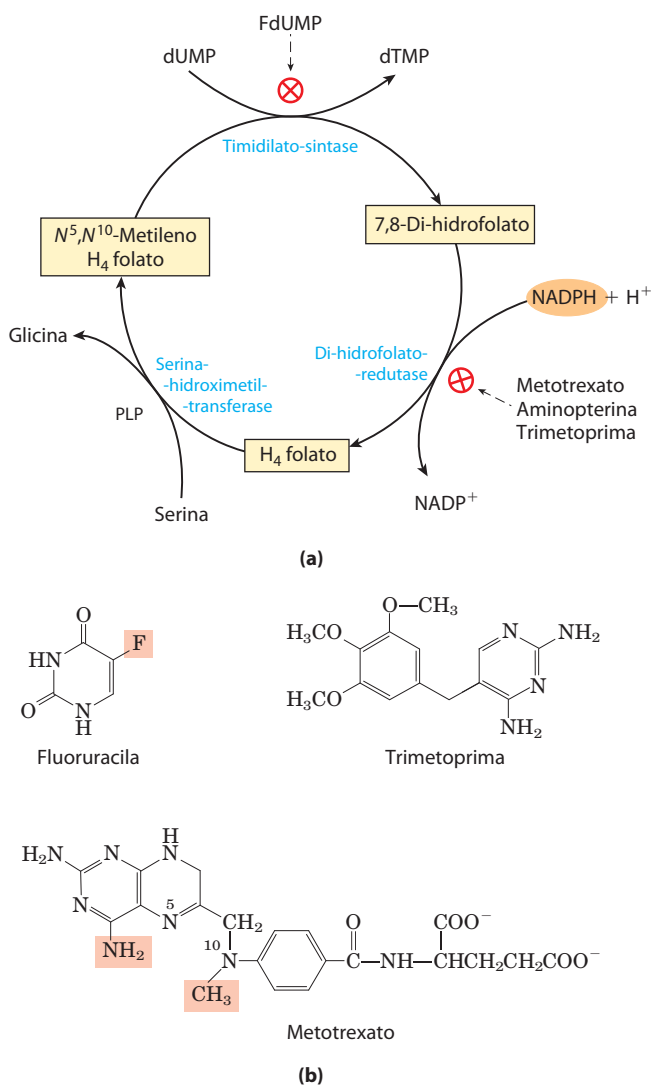
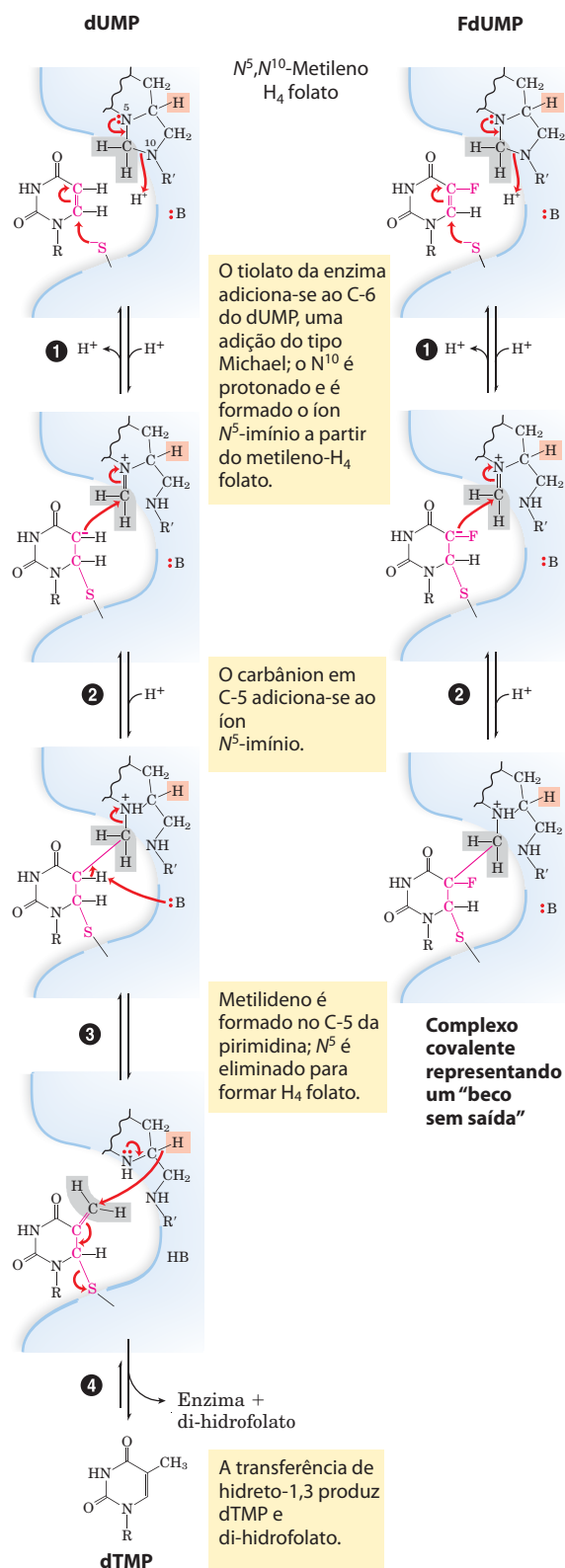



**FIGURA 22-52 Síntese de timidilato e metabolismo do folato como alvos para quimioterapia.** **(a)** Durante a síntese de timidilato, o $N^5$,$N^{10}$-metilenotetra-hidrofolato é convertido em 7,8-di-hidrofolato; o $N^5$,$N^{10}$-metilenotetra-hidrofolato é regenerado em dois passos (ver Figura 22-47). Esse ciclo é um alvo importante para diversos agentes quimioterápicos. **(b)** Fluoruracila e metotrexato são importantes agentes quimioterápicos. Nas células, a fluoruracila é convertida em FdUMP, que inibe a timidilato-sintase. O metotrexato, análogo estrutural do tetra-hidrofolato, inibe a di-hidrofolato-redutase; os grupos amino e metila sombreados substituem um oxigênio carbonílico e um átomo de hidrogênio, respectivamente, no folato (ver Figura 22-47). Outro importante análogo do folato, a aminopterina, é idêntico ao metotrexato, apenas não apresentando o grupo metila sombreado. Trimetoprima, inibidor que se liga firmemente à di-hidrofolato-redutase bacteriana, foi desenvolvido como um antibiótico.

**MECANISMO – FIGURA 22-53 Conversão de dUMP em dTMP e sua inibição por FdUMP.** No lado esquerdo, está representado o mecanismo normal de reação da timidilato-sintase. O grupo nucleofílico sulfidrila fornecido pela enzima na etapa ❶ e os átomos do anel do dUMP que tomam parte na reação são mostrados em vermelho; **:**B denota a cadeia lateral de um aminoácido que atua como base, para abstrair um próton após a etapa ❸. Os hidrogênios provenientes do grupo metileno do $N^5$,$N^{10}$-metilenotetra-hidrofolato estão sombreados em cinza. Uma transferência de hidreto 1,3 (etapa ❹) move um íon hidreto (sombreado em cor salmão) do C-6 do $H_4$-folato para o grupo metila da timidina, resultando na oxidação do tetra-hidrofolato em di-hidrofolato. Esta transferência do hidreto é bloqueada quando FdUMP é o substrato (à direita). As etapas ❶ e ❷ ocorrem normalmente, mas resultam em um complexo estável – consistindo em FdUMP ligado covalentemente à enzima e ao tetra-hidrofolato – o que inativa a enzima. **Mecanismo da timidilato-sintase**

protistas) são potenciais alvos. A **trimetoprima**, antibiótico desenvolvido por Hitchings e Elion, liga-se à di-hidrofolato--redutase bacteriana com eficiência cerca de 100.000 vezes maior do que se liga à enzima de mamíferos, sendo usada no tratamento de certas infecções bacterianas urinárias e do ouvido médio. Protistas parasíticos, como os tripanossomos que causam a doença do sono africana (tripanossomíase africana), não têm vias para a biossíntese *de novo* de nucleotídeos e são especialmente sensíveis a agentes que interferem em seus processos de captar, do ambiente, nucleotídeos a serem utilizados em vias de salvação. O alopurinol (Figura 22-50) e diversos análogos semelhantes das purinas têm se mostrado promissores para o tratamento da tripanossomíase africana e de doenças relacionadas. Consulte no Quadro 6-3 outra abordagem para o combate à tripanossomíase africana, possibilitada pelo avanço em nossa compreensão do metabolismo e dos mecanismos enzimáticos. ■

## RESUMO 22.4 Biossíntese e degradação de nucleotídeos

- O sistema de anéis das purinas é construído passo a passo, iniciando com 5-fosforribosilamina. Os aminoácidos glutamina, glicina e aspartato fornecem todos os átomos de nitrogênio das purinas. Os passos de fechamento dos dois anéis formam o núcleo das purinas.
- As pirimidinas são sintetizadas a partir de carbamoil--fosfato e de aspartato, e a ribose-5-fosfato é então ligada para produzir ribonucleotídeos pirimídicos.
- Nucleosídeos monofosfatados são convertidos em seus derivados trifosfatados por reações enzimáticas de fosforilação. Os ribonucleotídeos são convertidos em desoxirribonucleotídeos pela ribonucleotídeo-redutase, enzima com novas características mecanísticas e reguladoras. Os nucleotídeos da timina são derivados de dCDP e dUMP.
- O ácido úrico e a ureia são produtos finais da degradação de purinas e pirimidinas.
- Purinas livres podem ser usadas em vias de salvação, na reconstrução de nucleotídeos. Deficiências genéticas em certas enzimas das vias de salvação causam doenças graves, como a síndrome de Lesch-Nyhan e a deficiência de ADA.
- O acúmulo de cristais de ácido úrico nas articulações, possivelmente causado por outra deficiência genética, resulta na gota.
- Enzimas das vias de biossíntese de nucleotídeos são alvos de um conjunto de agentes quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer e de outras doenças.

## Termos-chave

*Os termos em negrito estão definidos no glossário.*

**ciclo do nitrogênio** 882
**fixação do nitrogênio** 882
**anamox** 882
**simbiontes** 882
**complexo da nitrogenase** 883
grupo P 883
cofator FeMo 883
leg-hemoglobina 888
glutamina-sintetase 888
glutamato-sintase 888
glutamina-amidotransferases 890
5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) 892
triptofano-sintase 898
**porfirinas** 902
**porfiria** 904
bilirrubina 904
fosfocreatina 906
creatina 906
glutationa (GSH) 906
**auxina** 908
dopamina 909
noradrenalina 909
adrenalina 909
$\gamma$-aminobutirato (GABA) 909
serotonina 909
histamina 909
cimetidina 909
espermina 909
espermidina 909
ornitina-descarboxilase 909
**via *de novo*** 910
**via de salvação** 910
inosinato (IMP) 912
carbamoil-fosfato-sintetase II 915
aspartato-transcarbamoilase 915
**nucleosídeo-monofosfato--cinase** 916
**nucleosídeo-difosfato--cinase** 916
ribonucleotídeo-redutase 917
tiorredoxina-redutase 917
timidilato-sintase 920
di-hidrofolato-redutase 920
deficiência de adenosina--desaminase (ADA) 921
síndrome de Lesch-Nyhan 922
alopurinol 922
azasserina 923
acivicina 923
fluoruracila 923
metotrexato 923
aminopterina 923

## Leituras adicionais

### Fixação de nitrogênio


**Arp, D.J. & Stein, L.Y.** (2003) Metabolism of inorganic N-compounds by ammonia-oxidizing bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. **38**, 491-495.

**Burris, R.H.** (1995) Breaking the N-N bound. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. **46**, 1-19.

**Eisenberg, D.S., Harindarpal, S., Gill, G., Pfluegl, M.U. & Rothstein, H.** (2000) Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**, 122-145.

**Fuerst, J.A.** (2005) Intracellular compartmentation in planctomycetes. *Annu. Rev. Microbiol*. **59**, 299-328.
Discussão avançada acerca da estrutura e da bioquímica dos organismos anamox.

**Igarishi, R.Y. & Seefeldt, L.C.** (2003) Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. **38**, 351-384.

**Lin, J.T. & Stewart, V.** (1998) Nitrate assimilation in bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol*. **39**, 1-30.

**Patriarca, E.J. Tate, R. & Iaccarino, M.** (2002) Key role of bacterial $NH_4^+$ metabolism in rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. **66**, 203-222.
Boa visão geral da assimilação da amônia em sistemas bacterianos e sua regulação.

**Prell, J. & Poole, P.** (2006) Metabolic changes of rhizobia in legume nodulles. *Trends Microbiol*. **14**, 161-168.
Bom resumo das intricadas relações simbióticas entre rizóbios e seus hospedeiros.

**Reese, D.C. & Howard, J.B.** (2000) Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr. Opin. Chem. Biol*. **4**, 559-566.

**Schwarz, G., Mendel, R.R. & Ribbe, M.W.** (2009) Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature* **460**, 839-847.

**Seefeldt, L.C., Hoffman, B.M. & Dean, D.R.** (2009) Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. *Annu. Rev. Biochem*. **78**, 701-722.

**Sinha, S.C. & Smith, J.L.** (2001) The PRT protein family. *Curr. Opin. Struct. Biol*. **11**, 733-739.

Descrição de uma família de proteínas que inclui muitas amidotransferases, com canais para o movimento da $NH_3$ de um sítio ativo para outro.

### Biossíntese de aminoácidos

**Frey, P.A. & Hegeman, A.D.** (2007) *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Oxford University Press, New York.

Resumo atualizado de mecanismos de reação, incluindo o metabolismo de grupos de um carbono e as enzimas dependentes de piridoxal-fosfato.

**Neidhardt, F.C. (ed.).** (1996) Escherichia coli *and* Salmonella: *Cellular and Molecular Biology*, 2nd edn, ASM Press, Washington, DC.

O volume 1 deste conjunto de 2 volumes apresenta 13 capítulos dedicados a descrições detalhadas da biossíntese de aminoácidos e nucleotídeos em bactérias. Uma versão atualizada regularmente pode ser encontrada na internet (www.ecosal.org). Fonte valiosa.

**Pan, P., Woehl, E. & Dunn, M.F.** (1997) Protein architecture, dynamics and allostery in tryptophan synthase channeling. *Trends Biochem. Sci*. **22**, 22-27.

**Richards, N.G.J. & Kilberg, M.S.** (2006) Asparagine synthetase chemotherapy. *Annu. Rev. Biochem*. **75**, 629-654.

**Stadtman, E.R.** (2001) The story of glutamine synthetase regulation. *J. Biol. Chem*. **276**, 44357-44364.

### Compostos derivados de aminoácidos

**Ajioka, R.S., Phillips, J.D. & Kushner, J.P.** (2006) Biosynthesis of heme in mammals. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res*. **1763**, 723-736.

**Bredt, D.S. & Snyder, S.H.** (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem*. **63**, 175-195.

**Meister, A. & Anderson, M.E.** (1983) Glutathione. *Annu. Rev. Biochem*. **52**, 711-760.

**Morse, D. & Choi, A.M.K.** (2002) Heme oxygenase-1 – the "emerging molecule" has arrived. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* **27**, 8-16.

**Rondon, M.R., Trzebiatowski, J.R. & Escalante-Semerena, J.C.** (1997) Biochemistry and molecular genetics of cobalamin biosynthesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol*. **56**, 347-384.

**Stadtman, T.C.** (1996) Selenocysteine. *Annu. Rev. Biochem*. **65**, 83-100.

### Biossíntese de nucleotídeos

**Aiuti, A., Cattaneo, R., Galimberti, S., Benninghoff, U., Cassani, B., Callegaro, L., Scaramuzza, S., Andolfi, G., Mirolo, M., Brigida, I., et al.** (2009) Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N. Engl. J. Med.* **360**, 447-458.

**Ando, N., Brignole, E.J., Zimanyi, C.M., Funk, M.A., Yokoyama, K., Asturias, F.J., Stubbe, J. & Drennan, C.L.** (2011) Structural interconvertions modulate activity of *Escherichia coli*, ribonucleotide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 21046-21051.

**Carreras, C.W. & Santi, D.V.** (1995) The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Annu. Rev. Biochem*. **64**, 721-762.

**Cotruvo, J.A., Jr. & Stubbe, J.** (2011) Class I ribonucleotide reductases: metallocofactor assembly and repair in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Biochem*. **80**, 733-767.

**Fairman, J.W., Wijerathna, S.R., Ahmad, M.F., Xu, H., Nakano, R., Jha, S., Prendergast, J., Welin, M., Flodin, S., Roos, A., et al.** (2011) Structural basis for allosteric regulation of human ribonucleotide reductase by nucleotide-induced oligomerization. *Nat. Struct. Mol. Biol*. **18**, 316-322.

**Herrick, J. & Sclavi, B.** (2007) Ribonucleotide reductase and the regulation of DNA replication: an old story and an ancient heritage. *Mol. Microbiol*. **63**, 22-34.

**Holmgren, A.** (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem*. **264**, 13963-13966.

**Kappock, T.J., Ealick, S.E. & Stubbe, J.** (2000) Modular evolution of the purine biosynthetic pathway. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 567-572.

**Kornberg, A. & Baker, T.A.** (1991) *DNA Replication*, 2nd edn, WH Freeman and Company, New York.

Este texto inclui um bom resumo da biossíntese de nucleotídeos.

**Licht, S., Gerfen G.J. & Stubbe, J.** (1996) Thiyl radicals in ribonucleotide reductases. *Science* **271**, 477-481.

**Nordlund, P. & Reichard, P.** (2006) Ribonucleotide reductases. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 681-706.

**Schachman, H.K.** (2000) Still looking for the ivory tower. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 1-29.

Vívida descrição da pesquisa sobre a aspartato-transcarbamoilase, acompanhada por encantadoras histórias de ciência e política.

**Weeks, A., Lund, L. & Raushel, F.M.** (2006) Tunneling of intermediates in enzyme-catalyzed reactions. *Curr. Opin. Chem. Biol*. **10**, 465-472.

### Doenças genéticas

**Löffler, M., Fairbanks, L.D., Zameitat, E., Marinaki, A.M. & Simmonds, H.A.** (2005) Pyrimidine pathways in health and disease. *Trends Mol. Med*. **11**, 430-437.

**Valle, D., Beaudet, A.L., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., Antonarakis, S.E. & Ballabio, A. (eds).** *Scriver's Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, www.ommbid.com. Publicado em janeiro 2006. Atualizado em 28 de março de 2011.

Esta enciclopédia médica clássica, publicada pela última vez em papel em 2001 como um conjunto de quatro volumes, é agora mantida na internet. Apresenta bons capítulos sobre doenças do metabolismo dos aminoácidos, das porfirinas e do heme. Confira também os capítulos sobre erros inatos do metabolismo de purinas e pirimidinas.

## Problemas

**1. Consumo de ATP nos nódulos das raízes de leguminosas.** Bactérias que residem nos nódulos das raízes de ervilhas consomem mais de 20% do ATP produzido pela planta. Sugira uma razão para esse alto consumo de ATP.

**2. Glutamato-desidrogenase e síntese proteica.** A bactéria *Methylophilus methylotrophus* pode sintetizar proteína a partir de metanol e amônia. Técnicas utilizando DNA recombinante melhoraram o rendimento da produção de proteínas pela introdução do gene da glutamato-desidrogenase de *E. coli* em *M. methylotrophus*. Por que essa manipulação genética aumenta o rendimento proteico?

**3. Mecanismos de reações utilizando PLP.** O piridoxal--fosfato pode ajudar a catalisar transformações envolvendo carbonos nas posições 1 ou 2 a partir do carbono $\alpha$ de um aminoácido. A enzima treonina-sintase (ver Figura 22-17) promo-

ve a conversão dependente de PLP de fosfo-homosserina em treonina. Sugira um mecanismo para essa reação.

**4. Transformação de aspartato em asparagina.** Há duas vias para a transformação de aspartato em asparagina, à custa de ATP. Muitas bactérias têm uma asparagina-sintetase que utiliza íons amônio como fonte de nitrogênio. Os mamíferos têm uma asparagina-sintetase que utiliza a glutamina como doador de nitrogênio. Uma vez que esse último processo requer um ATP extra (para a síntese de glutamina), por que os mamíferos utilizam essa via?

**5. Equação para a síntese de aspartato a partir de glicose.** Escreva a equação global para a síntese de aspartato (aminoácido não essencial) a partir de glicose, dióxido de carbono e amônia.

**6. Inibidores da asparagina-sintetase na terapia contra a leucemia.** A asparagina-sintetase dos mamíferos é uma amidotransferase dependente de glutamina. Esforços para a identificação de um inibidor efetivo da asparagina-sintetase humana para utilização como quimioterápico em pacientes com leucemia têm sido focalizados na porção carboxiterminal, onde se localiza o sítio ativo da sintetase, e não no domínio glutaminase, na porção aminoterminal. Explique por que o domínio glutaminase não é um alvo promissor para um medicamento eficaz.

**7. Deficiência de fenilalanina-hidroxilase e dieta.** A tirosina normalmente é um aminoácido não essencial, mas pessoas com defeito genético na fenilalanina-hidroxilase necessitam de tirosina em sua dieta para um crescimento normal. Explique.

**8. Cofatores em reações de transferência de um carbono.** A maioria das transferências de grupos de um carbono é promovida por um desses três cofatores: biotina, tetra-hidrofolato ou *S*-adenosilmetionina (Capítulo 18). A *S*-adenosilmetionina geralmente é utilizada como doador de grupos metil; o potencial de transferência do grupo metila no $N^5$-metiltetra-hidrofolato é insuficiente para a maioria das reações biossintéticas. Contudo, um exemplo de utilização de $N^5$-metiltetra-hidrofolato para a transferência do grupo metila ocorre na formação de metionina, catalisada pela metionina-sintase (etapa ❾ na Figura 22-17); a metionina é o precursor imediato da *S*-adenosilmetionina (ver Figura 18-18). Explique como o grupo metila da *S*-adenosilmetionina pode ser obtido a partir do $N^5$-metiltetra-hidrofolato, embora o potencial de transferência do grupo metila no $N^5$-metiltetra-hidrofolato seja um milésimo daquele do grupo metila na *S*-adenosilmetionina.

**9. Regulação orquestrada na biossíntese de aminoácidos.** A glutamina-sintetase de *E. coli* é modulada independentemente por vários produtos do metabolismo da glutamina (ver Figura 22-8). Nessa inibição concertada, o grau de inibição enzimática é maior que a soma dos efeitos inibidores causados pelos produtos separadamente. Para o crescimento da *E. coli* em um meio rico em histidina, qual seria a vantagem da inibição concertada?

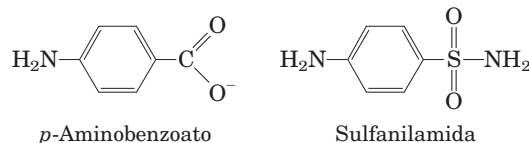
**10. Relação entre deficiência de ácido fólico e anemia.** A deficiência de ácido fólico, que se acredita ser a deficiência vitamínica mais comum, causa um tipo de anemia em que a síntese de hemoglobina está prejudicada e os eritrócitos não amadurecem adequadamente. Qual a relação metabólica entre a síntese de hemoglobina e a deficiência de ácido fólico?

**11. Biossíntese de nucleotídeos em bactérias auxotróficas para aminoácidos.** Células de *E. coli* do tipo selvagem podem sintetizar todos os 20 aminoácidos comuns. Contudo, alguns mutantes, chamados de auxotróficos para aminoácidos, são incapazes de sintetizar um determinado aminoácido e necessitam da adição desse aminoácido ao meio de cultura para um crescimento ótimo. Além de seu papel na síntese proteica, alguns aminoácidos são também precursores de outros produtos nitrogenados na célula. Considere três auxotróficos para aminoácidos, que são incapazes de sintetizar glicina, glutamina e aspartato, respectivamente. Para cada mutante, quais produtos nitrogenados a célula deixaria de sintetizar, além das proteínas?

**12. Inibidores da biossíntese de nucleotídeos.** Sugira mecanismos para a inibição da (a) alanina-racemase por L-fluoralanina e da (b) glutamina-amidotransferase pela azasserina.

**13. Mecanismo de ação das sulfas.** Algumas bactérias necessitam de *p*-aminobenzoato no meio de cultura para um crescimento normal, e seu crescimento é gravemente inibido pela adição de sulfanilamida, uma das primeiras sulfas utilizadas. Além disso, na presença desse fármaco, ocorre acúmulo de 5-aminoimidazol-4-carboxamida-ribonucleotídeo no meio de cultura (AICAR; ver Figura 22-35). Esses efeitos são revertidos pela adição de excesso de *p*-aminobenzoato.

$H_2N$–C₆H₄–$C(=O)O^-$      $H_2N$–C₆H₄–$S(=O)_2$–$NH_2$

*p*-Aminobenzoato      Sulfanilamida

(a) Qual a função do *p*-aminobenzoato nessas bactérias? (Dica: ver Figura 18-16.)

(b) Por que o AICAR se acumula na presença de sulfanilamida?

(c) Por que a inibição e o acúmulo são revertidos pela adição de excesso de *p*-aminobenzoato?

**14. Via para os carbonos na biossíntese de pirimidinas.** Determine os locais, na molécula do orotato, onde será encontrado $^{14}C$, quando esse composto é isolado de células crescidas em meio contendo uma pequena quantidade de [$^{14}C$]succinato uniformemente marcado. Justifique sua resposta.

**15. Nucleotídeos como fontes pobres para a obtenção de energia.** Em condições de falta de alimento, os organismos podem utilizar proteínas e aminoácidos como fonte de energia. A desaminação dos aminoácidos produz esqueletos de carbono que podem entrar na via glicolítica e no ciclo do ácido cítrico, produzindo energia na forma de ATP. Os nucleotídeos, por outro lado, não são degradados de forma semelhante para utilização como combustíveis para gerar energia. Quais observações da fisiologia celular apoiam essa afirmação? Quais aspectos da estrutura dos nucleotídeos os tornam uma fonte relativamente pobre de energia?

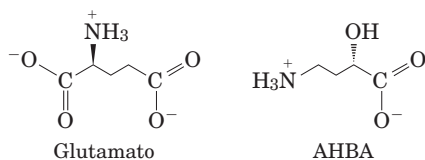
**16. Tratamento da gota.** O alopurinol (ver Figura 22-50), inibidor da xantina-oxidase, é utilizado para o tratamento da gota crônica. Explique a base bioquímica para esse tratamento. Pacientes tratados com alopurinol algumas vezes desenvolvem cálculos de xantina nos rins, embora a incidência de dano renal seja muito menor que na gota não tratada. Explique essa observação, considerando as solubilidades desses compostos na urina: ácido úrico, 0,15 g/L; xantina, 0,05 g/L; e hipoxantina, 1,4 g/L.

**17. Inibição da síntese de nucleotídeos pela azasserina.** O composto diazo *O*-(2-diazoacetil)-L-serina, também conhecido como azasserina (ver Figura 22-51), é um poderoso inibidor das glutamina-amidotransferases. Se células em crescimento são tratadas com azasserina, quais intermediários da biossíntese de nucleotídeos se acumulam? Explique.

## Problema de análise de dados

**18. Utilização de técnicas moleculares modernas na determinação da via biossintética de um novo aminoácido.** A maior parte das vias biossintéticas descritas neste capítulo foi determinada antes do desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante e da genômica, de modo que as técnicas eram bastante diferentes daquelas que os pesquisadores utilizariam hoje. Aqui é fornecido um exemplo de utilização de técnicas moleculares modernas para investigar a via de síntese de um novo aminoácido, (2*S*)-4-amino-2-hidroxibutirato (AHBA). As técnicas aqui mencionadas estão descritas em várias seções deste livro; este problema foi delineado para mostrar como essas técnicas podem ser integradas em um estudo abrangente.

O AHBA é um $\gamma$-aminoácido, componente de alguns antibióticos aminoglicosídicos, incluindo o antibiótico butirosina. Antibióticos modificados pela adição de um resíduo de AHBA, com frequência, são mais resistentes à inativação por enzimas bacterianas de resistência a antibióticos. Como resultado, a compreensão de como o AHBA é sintetizado e adicionado a antibióticos é útil para o planejamento de medicamentos.

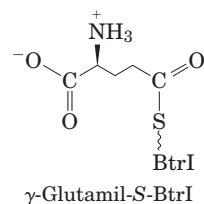
Em um artigo publicado em 2005, Li e colaboradores descrevem como determinaram a via de síntese do AHBA a partir do glutamato.

Glutamato AHBA

(a) Descreva sucintamente as transformações químicas necessárias para converter glutamato em AHBA. Neste ponto, não se preocupe com a *sequência* das reações.

Li e colaboradores começaram clonando o grupo de genes responsáveis pela biossíntese de butirosina na bactéria *Bacillus circulans*, que produz grandes quantidades desse antibiótico. Eles identificaram cinco genes essenciais para a via: *btrI, btrJ, btrK, btrO* e *btrV*. Os pesquisadores então clonaram esses genes em plasmídeos de *E. coli*, o que permite a superexpressão dos genes, produzindo proteínas com "etiquetas de histidina" fundidas a seus terminais amino para facilitar a purificação (ver Seção 9.1).

A sequência de aminoácidos prevista para a proteína BtrI mostrou forte homologia com proteínas carreadoras de acila (ver Figura 21-5). Utilizando espectrometria de massa, Li e colaboradores encontraram uma massa molecular de 11.812 para a proteína BtrI purificada (incluindo a etiqueta de His). Quando a proteína BtrI purificada foi incubada com coenzima A e com uma enzima capaz de ligar CoA a outras proteínas carreadoras de acilas, a espécie molecular principal apresentou $M_r$ de 12.153.

(b) Como você utilizaria esses dados para argumentar que a BtrI pode atuar como proteína carreadora de acilas com uma CoA como grupo prostético?

Utilizando a terminologia padrão, Li e colaboradores chamaram de apo-BtrI a forma da proteína não ligada à CoA, e a forma com a CoA (ligada como na Figura 21-5) foi denominada holo-BtrI. Quando a holo-BtrI foi incubada com glutamina, ATP e proteína BtrJ purificada, a espécie holo-BtrI de $M_r$ de 12.153 foi substituída por uma espécie de $M_r$ de 12.281, correspondendo ao tioéster de glutamato com holo-BtrI. Com base nesses dados, os autores propuseram a seguinte estrutura para a espécie de $M_r$ de 12.281 ($\gamma$-glutamil-*S*-BtrI):

$\gamma$-Glutamil-*S*-BtrI

(c) Que outra(s) estrutura(s) é(são) consistente(s) com esses dados?

(d) Li e colaboradores argumentaram que a estrutura aqui mostrada ($\gamma$-glutamil-*S*-BtrI) provavelmente seja a correta, pois o grupo $\alpha$-carboxila deve ser removido em algum momento do processo biossintético. Explique a base química para esse argumento. (Dica: ver Figura 18-6, reação C.)

A proteína BtrK mostrou significativa homologia com aminoácido-descarboxilases dependentes de PLP e descobriu-se que a BtrK isolada de *E. coli* continha PLP fortemente ligado. Quando $\gamma$-glutamil-*S*-BtrI foi incubada com BtrK purificada, foi produzida uma espécie molecular com $M_r$ de 12.240.

(e) Qual a estrutura mais provável para essa espécie?

(f) Curiosamente, quando os investigadores incubaram glutamato e ATP com BtrI, BtrJ e BtrK purificadas, observaram a produção de uma espécie molecular com $M_r$ de 12.370. Qual a estrutura mais provável para essa espécie? Dica: lembre-se que BtrJ pode utilizar ATP para ligar glutamato em grupos nucleofílicos através da $\gamma$-carboxila.

Li e colaboradores descobriram que a BtrO é homóloga a enzimas do tipo mono-oxigenase (ver Quadro 21-1), que hidroxilam alcanos, utilizando FMN como cofator, e que a BtrV é homóloga a uma NAD(P)H-oxidorredutase. Dois outros genes nesse núcleo, *btrG* e *btrH*, provavelmente codifiquem enzimas que removem o grupo $\gamma$-glutamila e ligam AHBA à molécula do antibiótico-alvo.

(g) Com base nesses dados, proponha uma via plausível para a síntese de AHBA e sua ligação ao antibiótico-alvo. Inclua as enzimas que catalisam cada passo e quaisquer outros substratos ou cofatores necessários (ATP, NAD, etc.).

### Referência

**Li, Y., Llewellyn, N.M., Giri, R., Huang, F. & Spencer, J.B.** (2005) Biosynthesis of the unique amino acid side chain of butirosin: possible protective-group chemistry in an acyl carrier protein-mediated pathway. *Chem. Biol*. **12**, 665-675.

23

# Regulação Hormonal e Integração do Metabolismo em Mamíferos



Dos Capítulos 13 a 22 foi discutido o metabolismo nas células individuais, enfatizando as vias centrais comuns a quase todas as células – bacterianas, arqueobacterianas e eucarióticas. Foi analisado como os processos metabólicos dentro das células são regulados nas reações enzimáticas individuais pela disponibilidade de substrato, por mecanismos alostéricos e por fosforilação ou outra modificação covalente das enzimas.

Para entender completamente o significado das vias metabólicas individuais e sua regulação, é necessário observar essas vias no contexto do organismo como um todo. Uma característica essencial dos organismos multicelulares é a diferenciação celular e a divisão de trabalho. As funções especializadas dos tecidos e órgãos de organismos complexos como os humanos impõem requerimentos energéticos característicos e padrões de metabolismo. Sinais hormonais integram e coordenam as atividades metabólicas de diferentes tecidos e otimizam a alocação de combustíveis e precursores para cada órgão.

Este capítulo terá como foco os mamíferos, detendo-se no metabolismo especializado de vários órgãos e tecidos importantes e na integração do metabolismo em todo o organismo. Começa examinando o amplo alcance dos hormônios e mecanismos hormonais, apresentando então as funções específicas de tecidos diferentes reguladas por esses mecanismos. Discute a distribuição dos nutrientes para vários órgãos – enfatizando o papel central desempenhado pelo fígado – e a cooperação metabólica entre esses órgãos. Para ilustrar o papel integrador dos hormônios, descreve a inter-relação entre a insulina, o glucagon e a adrenalina na coordenação do metabolismo energético no músculo, no fígado e no tecido adiposo. Os distúrbios metabólicos no diabetes ilustram a importância da regulação hormonal do metabolismo. Discute a regulação hormonal da massa corporal no longo prazo e, por fim, o papel da obesidade no desenvolvimento da síndrome metabólica e do diabetes.

## 23.1 Hormônios: estruturas diferentes para funções diferentes

**Hormônios** são pequenas moléculas ou proteínas produzidas em um tecido, liberadas na circulação e transportadas a outros tecidos, nos quais agem por meio de receptores para produzir mudanças nas atividades celulares. Eles servem para coordenar as atividades metabólicas de vários tecidos ou órgãos. Em um organismo complexo, praticamente cada processo é regulado por um ou mais hormônios: manutenção da pressão sanguínea, do volume sanguíneo e do equilíbrio de eletrólitos; embriogênese; diferenciação sexual, desenvolvimento e reprodução; fome, comportamento alimentar, digestão e distribuição de combustíveis – para citar apenas alguns. Esta seção examina os métodos de detecção e de medida de hormônios e sua interação com receptores; estuda, também, uma seleção representativa de tipos de hormônios.

A coordenação do metabolismo nos mamíferos é realizada pelo **sistema neuroendócrino.** As células de um determinado tecido sentem uma mudança nas condições do organismo e respondem secretando um mensageiro químico, que passa para outra célula no mesmo tecido ou em um tecido diferente, na qual o mensageiro se liga a uma molécula receptora e desencadeia uma mudança nesta segunda célula. Esses mensageiros químicos podem transmitir informação a distâncias muito curtas ou muito longas. Na sinalização neuronal (**Figura 23-1a**), o mensageiro químico é um neurotransmissor (p. ex., acetilcolina) e percorre somente uma fração de micrômero através da fenda sináptica até o neurônio seguinte em uma rede. Na sinalização hormonal, os mensageiros – hormônios – são transportados pela corrente sanguínea para células vizinhas ou para órgãos e tecidos distantes; eles podem percorrer um metro ou mais para encontrar suas células-alvo (Figura 23-1b). Exceto por essa diferença anatômica, esses dois mecanismos de sinalização química são muito semelhantes, e a mesma molécula pode às vezes agir como neurotransmissor e como hormônio. A adrenalina e a noradrenalina, por exemplo, servem como neurotransmissores em determinadas sinap-

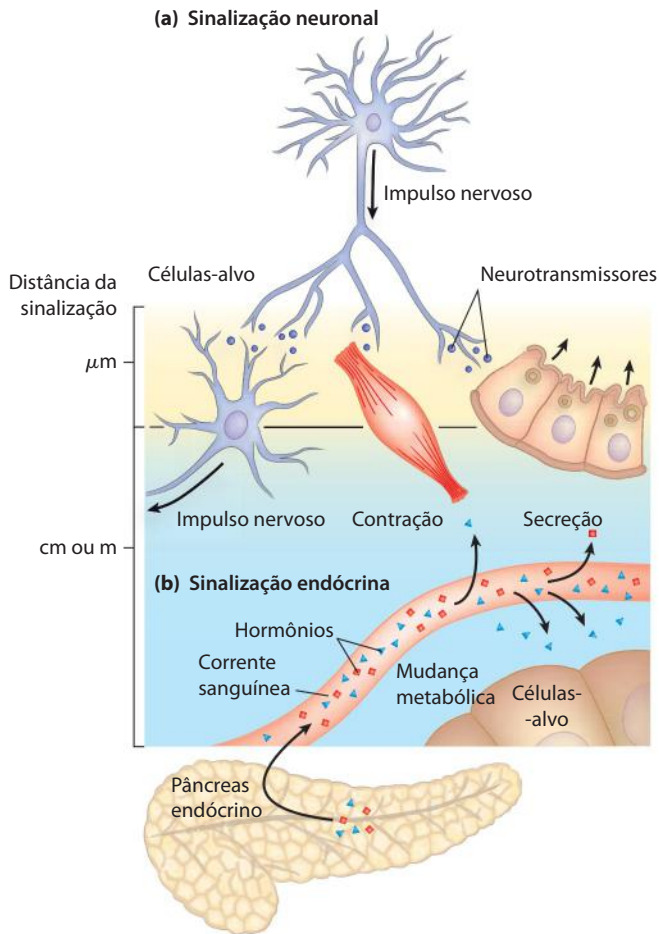



**FIGURA 23-1 Sinalização pelo sistema neuroendócrino. (a)** Na sinalização neuronal, sinais elétricos (impulsos nervosos) se originam no corpo celular de um neurônio e se propagam muito rapidamente por longas distâncias até a extremidade do axônio, onde os neurotransmissores são liberados e se difundem para a célula-alvo. A célula-alvo (outro neurônio, um miócito ou uma célula secretora) está a uma distância de apenas uma fração de micrômetro ou poucos micrômetros do local de liberação do neurotransmissor. **(b)** Na sinalização endócrina, os hormônios (tais como insulina produzida nas células $\beta$ pancreáticas) são secretados para a corrente sanguínea, que os transporta pelo corpo até os tecidos-alvo, que podem estar a uma distância de um metro ou mais da célula secretora. Tanto os neurotransmissores quanto os hormônios interagem com receptores específicos na superfície ou no interior de suas células-alvo, desencadeando as respostas.

ses do cérebro e nas junções neuromusculares do músculo liso, e como hormônios que regulam o metabolismo energético no fígado e no músculo. A discussão que se segue sobre a sinalização celular enfatiza a ação hormonal, esboçada nas discussões sobre metabolismo energético nos capítulos anteriores, mas a maioria dos mecanismos fundamentais aqui descritos também ocorre na ação neurotransmissora.

## A detecção e a purificação dos hormônios requerem um bioensaio

Como é detectado e isolado um hormônio? Em primeiro lugar, os pesquisadores descobrem que um processo fisiológico em um tecido depende de um sinal que tem origem em outro tecido. A insulina, por exemplo, primeiramente foi reconhecida como substância produzida no pâncreas e que afeta a concentração da glicose no sangue e na urina (Quadro 23-1). Uma vez descoberto o efeito fisiológico do suposto hormônio, foi possível desenvolver um bioensaio quantitativo para ele. No caso da insulina, o ensaio consistiu na injeção de extratos de pâncreas (fonte bruta de insulina) em animais experimentais deficientes em insulina, quantificando-se então as alterações na concentração de glicose no sangue e na urina. Para isolar um hormônio, o bioquímico fraciona os extratos que contêm o suposto hormônio com as mesmas técnicas usadas para purificar outras biomoléculas (fracionamento com solvente, cromatografia e eletroforese), testando cada fração quanto à atividade hormonal. Uma vez purificado, sua composição e estrutura podem ser determinadas.

Esse protocolo para caracterização hormonal é ilusoriamente simples. Os hormônios são extremamente potentes e são produzidos em quantidades muito pequenas. A obtenção de hormônio suficiente para permitir sua caracterização química com frequência envolve isolamentos bioquímicos em uma escala heroica. Quando Andrew Schally e Roger Guillemin, de modo independente, purificaram e caracterizaram o hormônio liberador de tirotropina (TRH, de *thyrotropin-releasing hormone*) do hipotálamo, o grupo de Schally utilizou cerca de 20 toneladas de hipotálamos de aproximadamente dois milhões de ovelhas, e o grupo de Guillemin extraiu hipotálamos de cerca de um milhão de porcos! O TRH foi identificado como um derivado simples do tripeptídeo Glu-His-Pro (**Figura 23-2**). Uma vez conhecida a estrutura, esse hormônio pode ser sintetizado quimicamente em grandes quantidades para uso nos estudos fisiológicos e bioquímicos.

Por seus trabalhos com os hormônios hipotalâmicos, Schally e Guillemin receberam, em 1977, o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina, juntamente com Rosalyn Yalow, que, com Solomon A. Berson, desenvolveu o **radioimunoensaio** (**RIE**), ensaio extremamente sensível para a detecção de hormônios peptídicos, e o utilizou para estudar a ação hormonal. O RIE revolucionou a pesquisa com hormônios por tornar possível a medição de quantidades muito pequenas de hormônios de forma rápida, quantitativa e específica.

Anticorpos específicos para hormônios são a chave para o radioimunoensaio e seu equivalente moderno, ensaio imunoadsorvente ligado a enzima (Elisa; ver Figura 5-26b). Hormônios purificados, injetados em coelhos ou camundongos, induzem a produção de anticorpos que se ligam ao hormônio com afinidade e especificidade muito altas. Esses anticorpos podem ser purificados e marcados com radioisótopos (para RIE) ou conjugados com uma enzima que gera um produto colorido (para Elisa). Os anticorpos marcados interagem com extratos contendo o hormônio. A fração do anticorpo que se liga ao hormônio no extrato é quantificada pela detecção da radiação ou por fotometria. Devido à alta afinidade do anticorpo pelo hormônio, tais ensaios podem ser sensíveis a picogramas de hormônio em uma amostra.

## QUADRO 23-1  MEDICINA Como é descoberto um hormônio? O árduo caminho até a insulina purificada

Milhões de pessoas com diabetes melito tipo 1 injetam diariamente em si mesmas insulina pura, para compensar a falta de produção deste hormônio essencial por suas próprias células $\beta$ pancreáticas. A injeção de insulina não é a cura para o diabetes, mas permite uma vida longa e produtiva a pessoas que, de outra forma, morreriam jovens. A descoberta da insulina, que começou com uma observação acidental, ilustra a combinação de serendipidade e experimentação cuidadosa que levou à descoberta de muitos hormônios.

Em 1889, Oskar Minkowski, jovem assistente na Faculdade de Medicina de Estrasburgo, e Josef von Mering, do Instituto Hoppe-Seyler, também em Estrasburgo, tiveram uma discussão amigável sobre a importância do pâncreas, conhecido por conter lipases, na digestão de gorduras em cães. Para resolver a questão, eles começaram um experimento sobre a digestão das gorduras. Removeram cirurgicamente o pâncreas de um cão, mas antes que o experimento prosseguisse, Minkowski observou que o cão agora estava produzindo muito mais urina do que em condições normais (sintoma comum do diabetes não tratado). Além disso, a urina continha níveis de glicose acima do normal (outro sintoma de diabetes). Esses resultados sugeriram que a falta de algum produto pancreático causaria o diabetes.

Minkowski tentou, sem sucesso, preparar um extrato de pâncreas de cão que pudesse reverter o efeito da remoção do órgão – isto é, baixar os níveis de glicose no sangue e na urina. Hoje sabe-se que a insulina é uma proteína, e que o pâncreas é muito rico em proteases (tripsina e quimotripsina), normalmente liberadas no intestino delgado para auxiliar na digestão. Sem dúvida essas proteases degradavam a insulina nos extratos pancreáticos dos experimentos de Minkowski.

Apesar de esforços consideráveis, nenhum progresso significativo foi obtido no isolamento ou na caracterização do "fator antidiabético" até o verão de 1921, quando Frederick G. Banting, jovem cientista trabalhando no laboratório de J. J. R. MacLeod, na Universidade de Toronto, e um estudante assistente, Charles Best, dedicaram-se ao problema. Nessa época, várias evidências apontavam para um grupo de células especializadas no pâncreas (as ilhotas de Langerhans; ver Figura 23-26) como a fonte do fator antidiabético, o qual viria a ser chamado de insulina (do latim *insula*, "ilha").

Tomando precauções para impedir a proteólise, Banting e Best (mais tarde auxiliados pelo bioquímico J. B. Collip) conseguiram, em dezembro de 1921, preparar um extrato pancreático purificado que curava os sintomas do diabetes experimental em cães. Em 25 de janeiro de 1922 (somente um mês mais tarde!), sua preparação de insulina foi injetada em Leonard Thompson, um menino de 14 anos gravemente doente com diabetes melito. Em poucos dias, os níveis de corpos cetônicos e de glicose na urina de Thompson diminuíram drasticamente; o extrato salvou sua vida e a vida de um grande número de crianças seriamente doentes que também receberam essas preparações (Figura Q-1). Em 1923, Banting e MacLeod receberam o Prêmio Nobel pelo isolamento da insulina. Banting anunciou imediatamente que dividiria seu prêmio com Best; MacLeod dividiu o seu com Collip.

Já em 1923, as companhias farmacêuticas forneciam insulina extraída de pâncreas de porco a milhares de pacientes ao redor do mundo. Com o desenvolvimento das técnicas de engenharia genética, na década de 1980 (Capítulo 9), tornou-se possível produzir quantidades ilimitadas de insulina humana pela inserção do gene clonado da insulina humana em um microrganismo, o qual foi então cultivado em escala industrial. Alguns pacientes com diabetes estão usando bombas de insulina implantadas, que liberam quantidades ajustáveis do hormônio para satisfazer às necessidades no horário das refeições e durante o exercício. Existe uma perspectiva razoável de que, no futuro, o transplante de tecido pancreático forneça aos pacientes diabéticos uma fonte de insulina que responda tão bem quanto o pâncreas normal, liberando insulina na corrente sanguínea somente quando a glicose aumentar no sangue.

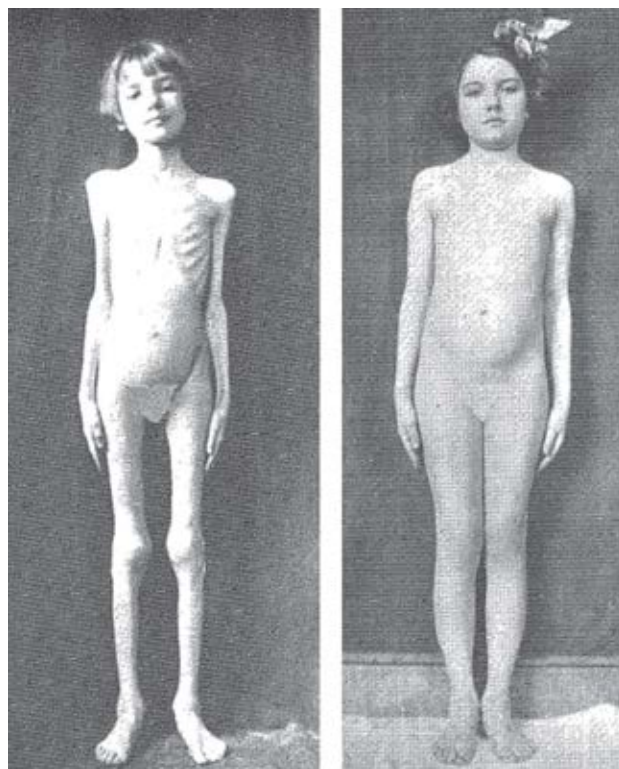



**FIGURA Q-1** Criança com diabetes tipo 1 antes (à esquerda) e após (à direita) três meses de tratamento com uma preparação de insulina.

Piroglutamato Histidina Prolilamida

piroGlu–His–Pro–$NH_2$

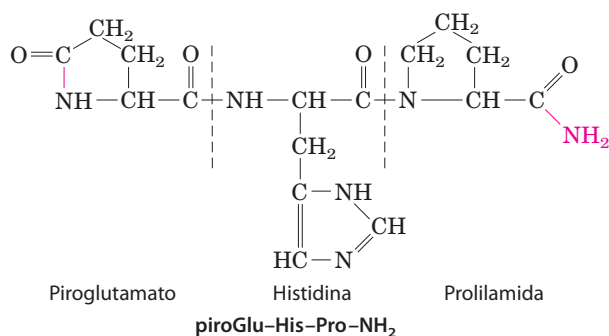



**FIGURA 23-2 Estrutura do hormônio liberador de tirotropina (TRH).** Purificado (após heroicos esforços) de extratos de hipotálamo, o TRH é um derivado do tripeptídeo Glu-His-Pro. O grupo carboxílico da cadeia lateral do Glu aminoterminal forma uma amida (ligação em vermelho) com o grupo $\alpha$-amino deste resíduo, criando o piroglutamato, e o grupo carboxílico da Pro carboxiterminal é convertido em uma amida ($NH_2$ em vermelho). Estas modificações são comuns entre os hormônios peptídicos pequenos. Em uma proteína típica de $M_r \sim 50.000$, as mudanças nos grupos amino e carboxiterminais contribuem muito pouco para a carga total da molécula, mas em um tripeptídeo estas duas cargas dominam as propriedades da molécula. A formação de derivados amida remove estas cargas.

## Os hormônios atuam por meio de receptores celulares específicos de alta afinidade

Conforme foi visto no Capítulo 12, todos os hormônios agem por meio de receptores altamente específicos nas células-alvo sensíveis a eles, e os hormônios se ligam a esses receptores com alta afinidade. Cada tipo celular tem sua própria combinação de receptores hormonais, os quais definem o espectro da capacidade de resposta da célula aos hormônios. Além disso, dois tipos celulares com o mesmo tipo de receptor podem ter diferentes alvos intracelulares da ação hormonal e, assim, podem responder de modo diferente ao mesmo hormônio. A especificidade da ação hormonal resulta da complementaridade estrutural entre o hormônio e seu receptor; essa interação é extremamente seletiva, de modo que até mesmo hormônios estruturalmente semelhantes podem ter efeitos diferentes se ligarem-se preferencialmente a receptores diferentes. A alta afinidade da interação permite às células responder a concentrações muito baixas do hormônio. No delineamento de fármacos planejados para intervir na regulação hormonal, é preciso conhecer a especificidade relativa e a afinidade do fármaco e do hormônio natural. Recorde que as interações hormônio-receptor podem ser quantificadas pela **análise de Scatchard** (ver Quadro 12-1), a qual, sob condições favoráveis, produz uma medida quantitativa da afinidade (a constante de dissociação do complexo) e do número de sítios de ligação ao hormônio em uma preparação de receptor.

As consequências intracelulares das interações ligante-receptor são de, pelo menos, cinco tipos: (1) um segundo mensageiro (como o cAMP, cGMP ou o inositol-trifosfato) gerado dentro da célula atua como um regulador alostérico de uma ou mais enzimas, (2) um receptor do tipo tirosina-cinase é ativado pelo hormônio extracelular, (3) a abertura ou o fechamento de canais iônicos controlados por hormônios resulta em uma mudança no potencial de membrana, (4) um receptor de adesão na superfície celular envia informação da matriz extracelular para o citoesqueleto, ou (5) um esteroide ou uma molécula semelhante a um esteroide causa uma mudança no nível de expressão (transcrição de DNA em mRNA) de um ou mais genes, mediada por uma proteína receptora hormonal nuclear (ver a Figura 12-2).

Os hormônios peptídicos e amínicos, que são hidrossolúveis (insulina e adrenalina, por exemplo), atuam extracelularmente por se ligarem a receptores de superfície celular que atravessam a membrana plasmática (**Figura 23-3**). Quando o hormônio se liga ao domínio extracelular do receptor, ele sofre uma mudança de conformação análoga à produzida em uma enzima alostérica pela ligação de uma molécula efetora. A mudança de conformação desencadeia os efeitos a jusante do hormônio.

Uma única molécula de hormônio, ao formar um complexo hormônio-receptor, ativa um catalisador que produz muitas moléculas do segundo mensageiro, de forma que o receptor serve não somente como um transdutor de sinal, mas também como um amplificador dele. O sinal pode ser amplificado mais adiante por uma cascata de sinalização, uma série de etapas nas quais o catalisador ativa outro catalisador, resultando em amplificações muito grandes do sinal original. Uma cascata desse tipo ocorre na regulação, pela adrenalina, da síntese e da de-

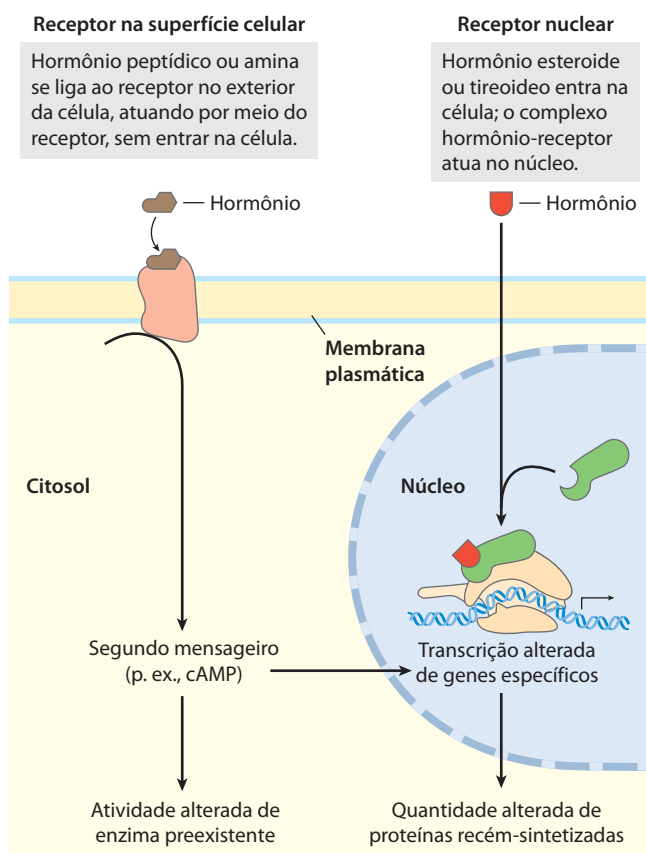



**FIGURA 23-3 Dois mecanismos gerais da ação hormonal.** Os hormônios peptídicos e do tipo amina agem mais rapidamente do que os esteroides e os tireoideos.

gradação do glicogênio (ver Figura 12-7). A adrenalina ativa (por meio de seu receptor) a adenilato-ciclase, que produz muitas moléculas de cAMP para cada molécula de hormônio ligado ao receptor. O cAMP, por sua vez, ativa a proteína-cinase dependente de cAMP (proteína-cinase A), a qual ativa a glicogênio-fosforilase *b*-cinase, que ativa a glicogênio-fosforilase *b*. O resultado é a amplificação do sinal: uma molécula de adrenalina induz a produção de muitos milhares ou milhões de moléculas de glicose-1-fosfato a partir do glicogênio.

Os hormônios insolúveis em água (hormônios esteroides, retinoides e da tireoide) atravessam a membrana plasmática de suas células-alvo para alcançar suas proteínas receptoras no núcleo (Figura 23-3). Nessa classe de hormônios, o próprio complexo hormônio-receptor carrega a mensagem; ele interage com o DNA para alterar a expressão de genes específicos, mudando o complemento enzimático da célula e mudando, desta forma, o metabolismo celular (ver Figura 12-30).

Os hormônios que atuam por meio de receptores de membrana plasmática geralmente provocam respostas bioquímicas ou fisiológicas muito rápidas. Poucos segundos após a secreção de adrenalina pela medula suprarrenal para a corrente sanguínea, o músculo esquelético responde acelerando a degradação de glicogênio. Em contrapartida, os hormônios da tireoide e os hormônios sexuais (esteroides) promovem respostas máximas em seus tecidos-alvo somente após horas ou mesmo dias. Essas diferenças no tempo de resposta correspondem a modos diferentes de ação. Geralmente, os hormônios de ação rápida levam a uma mudança na atividade de uma ou mais enzimas preexistentes na célula, por mecanismos alostéricos ou modificação covalente. Os hormônios de ação mais lenta geralmente alteram a expressão gênica, resultando na síntese de mais (regulação positiva) ou menos (regulação negativa) quantidade da(s) proteína(s) regulada(s).

## Os hormônios são quimicamente diferentes

Os mamíferos têm várias classes de hormônios, distinguíveis por suas estruturas químicas e por seu mecanismo de ação (Tabela 23-1). Os hormônios peptídicos, as catecolaminas e os eicosanoides agem a partir do exterior da célula-alvo via receptores de superfície. Os hormônios esteroides, a vitamina D, os retinoides e os hormônios da tireoide entram na célula e atuam por meio de receptores nucleares. O óxido nítrico (um gás) também entra na célula, mas ativa uma enzima citosólica, a guanilato-ciclase (ver Figura 12-20).

Os hormônios também podem ser classificados pelo trajeto que fazem desde o ponto de liberação até as células-alvo. Os hormônios **endócrinos** (do grego, *endon* = "dentro de", e *krinein* = "liberar") são liberados no sangue e transportados para as células-alvo por todo o corpo (a insulina e o glucagon são exemplos). Os hormônios **parácrinos** são liberados no espaço extracelular e difundem-se para células-alvo vizinhas (os hormônios eicosanoides são desse tipo). Os hormônios **autócrinos** afetam a mesma célula que os libera, ligando-se a receptores na superfície celular.

Os mamíferos não são os únicos com sistemas de sinalização hormonal: os insetos e os vermes nematódeos têm sistemas de regulação hormonal altamente desenvolvidos, com mecanismos básicos similares aos dos mamíferos. As plantas também usam sinais hormonais para coordenar as atividades de seus tecidos (Capítulo 12). O estudo da ação hormonal nas plantas não está tão avançado quanto nos animais, mas sabe-se que alguns mecanismos são compartilhados.

Para ilustrar a diversidade estrutural e o espectro de ação dos hormônios dos mamíferos, serão estudados exemplos representativos das principais classes apresentadas na Tabela 23-1.

**Hormônios peptídicos** Os hormônios peptídicos podem ter de 3 a mais de 200 resíduos de aminoácidos. Eles incluem os hormônios pancreáticos insulina, glucagon e somatostatina; o hormônio paratireoideo calcitonina e todos os hormônios do hipotálamo e da hipófise (descritos a seguir). Esses hormônios são sintetizados nos ribossomos na forma de proteínas precursoras mais longas (pró-hormônios), sendo então acondicionados em vesículas secretoras e

**TABELA 23-1** Classes de hormônios

| Tipo | Exemplo | Via de síntese | Modo de ação |
|---|---|---|---|
| Peptídeo | Insulina, glucagon | Processamento proteolítico de pró-hormônio | Receptores de membrana plasmática; segundos mensageiros |
| Catecolamina | Adrenalina | A partir da tirosina | |
| Eicosanoide | $PGE_1$ | A partir do araquidonato (ácido graxo 20:4) | |
| Esteroide | Testosterona | A partir do colesterol | Receptores nucleares; regulação da transcrição |
| Vitamina D | $1\alpha$,25-Di-hidroxivitamina $D_3$ | A partir do colesterol | |
| Retinoide | Ácido retinoico | A partir da vitamina A | |
| Tireoide | Tri-iodotironina ($T_3$) | A partir da tirosina na tireoglobulina | |
| Óxido nítrico | Óxido nítrico | A partir da arginina + $O_2$ | Receptor citosólico (guanilato-ciclase) e segundo mensageiro (cGMP) |

processados proteoliticamente para formar os peptídeos ativos. A **insulina** é uma proteína pequena ($M_r$ 5.800) com duas cadeias polipeptídicas, A e B, unidas por duas ligações dissulfeto. Ela é sintetizada no pâncreas como um precursor inativo de uma só cadeia, a pré-pró-insulina (**Figura 23-4**), com uma "sequência sinalizadora" aminoterminal que direciona sua passagem para as vesículas de secreção. (As sequências sinalizadoras são apresentadas no Capítulo 27; ver a Figura 27-38.) A remoção proteolítica da sequência sinalizadora e a formação de três ligações dissulfeto produzem a pró-insulina, que é armazenada em grânulos secretores (vesículas envoltas por membrana, repletas da proteína sintetizada no retículo endoplasmático) nas células $\beta$ pancreáticas. Quando a glicose sanguínea estiver suficientemente elevada para desencadear a secreção da insulina, a pró-insulina é convertida em insulina ativa por proteases específicas, que hidrolisam duas ligações peptídicas e formam a molécula de insulina madura e o peptídeo C, que são liberados por exocitose no sangue.

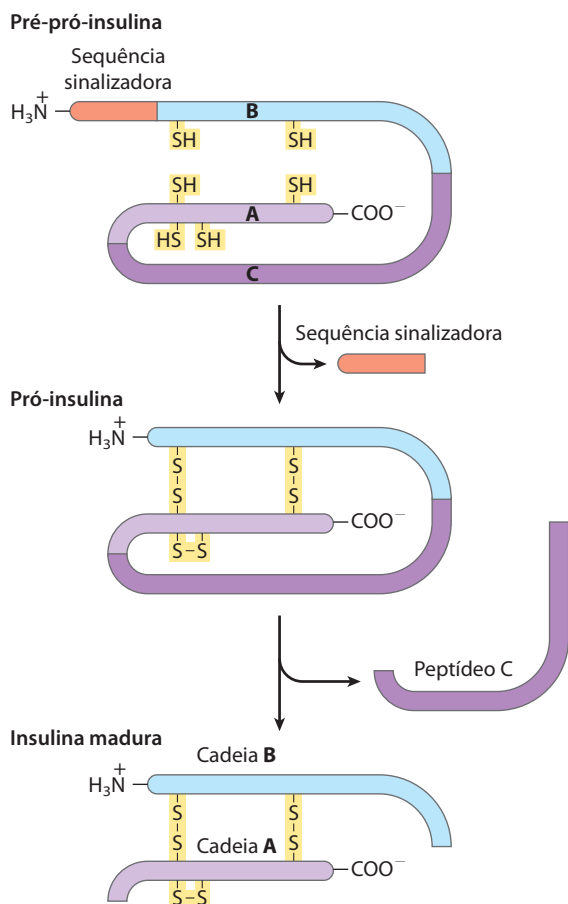



**FIGURA 23-4** **Insulina.** A insulina madura é formada por processamento proteolítico de seu precursor mais longo, a pré-pró-insulina. A remoção de um segmento de 23 aminoácidos (a sequência sinalizadora) da extremidade aminoterminal da pré-pró-insulina e a formação de três ligações dissulfeto geram a pró-insulina. Uma proteólise adicional remove o peptídeo C da pró-insulina e produz a insulina madura, composta pelas cadeias A e B. A Figura 3-24 mostra a sequência de aminoácidos da insulina bovina.

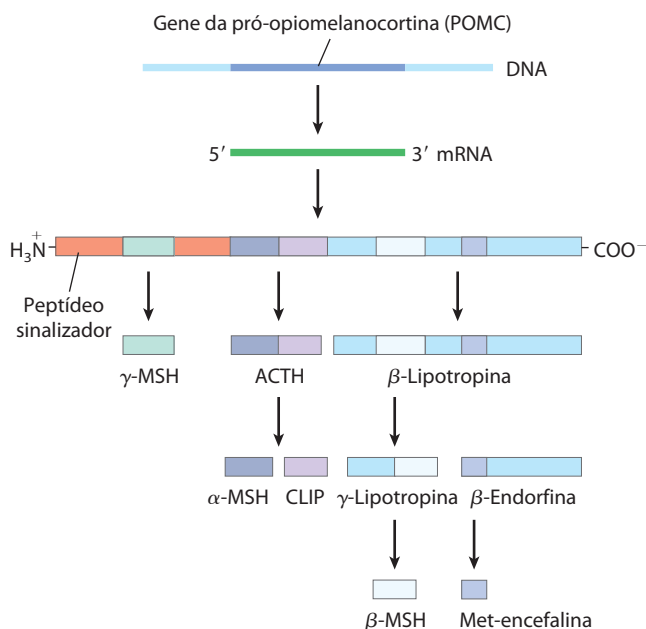
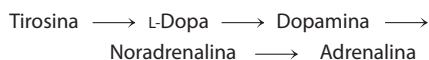



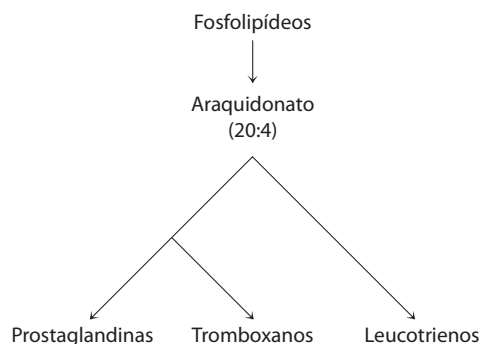
**FIGURA 23-5** **Processamento proteolítico do precursor pró-opiomelanocortina (POMC).** O produto inicial do gene POMC é um polipeptídeo longo que sofre clivagem por uma série de proteases específicas para a produção de ACTH, $\beta$ e $\gamma$-lipotropina, $\alpha$, $\beta$ e $\gamma$-MSH (hormônio estimulador de melanócitos, ou melanocortina), CLIP (peptídeo intermediário semelhante à corticotropina), $\beta$-endorfina e Met-encefalina. Os pontos de hidrólise são pares de resíduos básicos, Arg-Lys, Lys-Arg ou Lys-Lys.

Em alguns casos, as proteínas pró-hormonais não produzem somente um, mas vários hormônios ativos. A pró-opiomelanocortina (POMC) é um exemplo espetacular de hormônios múltiplos codificados por um único gene. O gene da POMC codifica um polipeptídeo grande que é progressivamente dividido em pelo menos nove peptídeos biologicamente ativos (**Figura 23-5**). Em muitos hormônios peptídicos, como no TRH, os resíduos terminais são modificados (Figura 23-2).

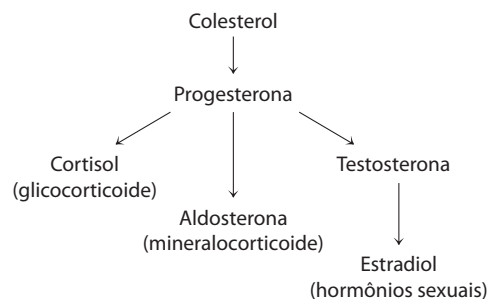
A concentração dos hormônios peptídicos nos grânulos secretores é tão alta que o conteúdo da vesícula é praticamente cristalino; quando o conteúdo é liberado por exocitose, uma grande quantidade do hormônio é liberada rapidamente. Os capilares que irrigam as glândulas endócrinas produtoras de peptídeos são fenestrados (pontuados com minúsculos orifícios ou "janelas"), de forma que as moléculas do hormônio entram rapidamente na corrente sanguínea para transporte para as células-alvo situadas em outros lugares. Conforme observado anteriormente, todos os hormônios peptídicos agem pela ligação aos receptores na membrana plasmática. Eles levam à geração de um segundo mensageiro no citosol, que muda a atividade de uma enzima intracelular, alterando, assim, o metabolismo celular.

**Hormônios catecolamínicos** Os compostos hidrossolúveis **adrenalina (epinefrina)** e **noradrenalina (norepinefrina)** são **catecolaminas**, assim denominadas devido ao composto catecol, estruturalmente relacionado. São sintetizadas a partir da tirosina (ver Figura 22-31).

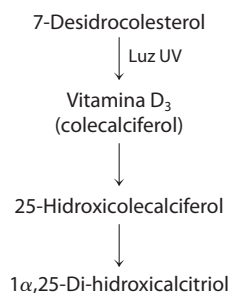
Tirosina ⟶ L-Dopa ⟶ Dopamina ⟶
Noradrenalina ⟶ Adrenalina

As catecolaminas produzidas no cérebro e em outros tecidos neurais atuam como neurotransmissores, mas a adrenalina e a noradrenalina também são hormônios, sintetizados e secretados pelas glândulas suprarrenais. À semelhança dos hormônios peptídicos, as catecolaminas encontram-se altamente concentradas nas vesículas secretoras, são liberadas por exocitose e atuam por meio de receptores de superfície para gerar segundos mensageiros intracelulares. Eles controlam uma ampla variedade de respostas fisiológicas ao estresse agudo (ver Tabela 23-6).

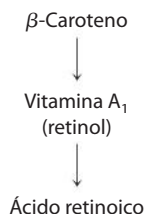
**Hormônios eicosanoides** Os hormônios eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos) são derivados do araquidonato, ácido graxo poli-insaturado de 20 carbonos.

Ao contrário dos hormônios descritos anteriormente, eles não são sintetizados previamente e armazenados; quando necessários, são produzidos a partir do araquidonato, que é liberado enzimaticamente dos fosfolipídeos de membrana pela fosfolipase $A_2$. As enzimas da via que leva às prostaglandinas e aos tromboxanos estão amplamente distribuídas nos tecidos dos mamíferos; a maioria das células pode produzir estes sinais hormonais, e as células de muitos tecidos podem responder a eles por meio de receptores específicos na membrana plasmática. Os hormônios eicosanoides são hormônios parácrinos, secretados no fluido intersticial (não no sangue), e agem em células próximas.

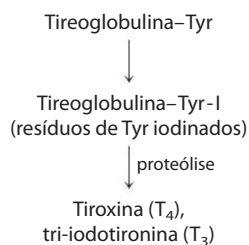
As prostaglandinas promovem a contração da musculatura lisa, incluindo a do intestino e do útero (podendo por isso ser utilizadas na clínica para induzir o parto). Também são responsáveis por mediar a dor e a inflamação em todos os tecidos. Muitos fármacos anti-inflamatórios agem inibindo etapas da via de síntese das prostaglandinas (ver Figura 21-15). Os tromboxanos regulam a função das plaquetas e, consequentemente, a coagulação sanguínea (ver Figura 6-39). Os leucotrienos $LTC_4$ e $LTD_4$ agem, por meio de receptores de membrana, estimulando a contração da musculatura lisa no intestino, nas vias aéreas pulmonares e na traqueia. São mediadores da anafilaxia, resposta imune exagerada que pode incluir constrição das vias aéreas, frequência cardíaca alterada, choque e, às vezes, a morte. ■

**Hormônios esteroides** Os hormônios esteroides (hormônios adrenocorticais e sexuais) são sintetizados em vários tecidos endócrinos a partir do colesterol.

Deslocam-se até suas células-alvo pela corrente sanguínea, ligados a proteínas carregadoras. No córtex suprarrenal são produzidos mais de 50 hormônios corticosteroides, por reações que removem a cadeia lateral do anel D do colesterol e introduzem oxigênio, formando grupos cetona e hidroxil. Muitas dessas reações envolvem as enzimas do citocromo P-450 (ver Quadro 21-1). Os corticosteroides são de dois tipos gerais, definidos por suas ações. Os glicocorticoides (como o cortisol) afetam principalmente o metabolismo dos carboidratos; os mineralocorticoides (como a aldosterona) regulam a concentração de eletrólitos ($K^+$, $Na^+$, $Ca^{+2}$, $Cl^-$) no sangue. Os androgênios (como a testosterona) e os estrogênios (como o estradiol; ver a Figura 10-19) são sintetizados nos testículos e ovários. Eles afetam o desenvolvimento e o comportamento sexuais, e uma grande variedade de outras funções reprodutivas e não reprodutivas. Sua síntese também envolve as enzimas do citocromo P-450 que clivam a cadeia lateral do colesterol e introduzem átomos de oxigênio.

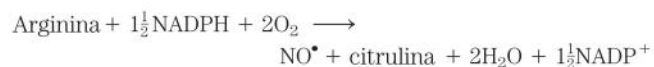
Todos os hormônios esteroides atuam por meio de receptores nucleares e alteram o nível de expressão de genes específicos (ver Figura 12-30). Também podem ter efeitos mais rápidos, mediados por receptores na membrana plasmática.

**Hormônio vitamina D** O calcitriol (1$\alpha$,25-di-hidroxicalcitriol) é produzido nos rins e no fígado (ver Figura 10-20a) a partir da vitamina D por hidroxilação enzimática. A vitamina D é obtida da dieta ou por fotólise do 7-desidrocolesterol na pele exposta à luz solar.

O calcitriol atua juntamente com o hormônio paratireoideo na homeostasia do $Ca^{2+}$, regulando a concentração deste íon no sangue e o equilíbrio entre a deposição de $Ca^{2+}$ e a sua mobilização do osso. O calcitriol, agindo por meio de receptores nucleares, ativa a síntese de uma proteína intestinal ligadora de $Ca^{2+}$ essencial para a captação de $Ca^{2+}$ da dieta. Ingestão inadequada de vitamina D e defeitos na biossíntese de calcitriol resultam em doenças graves como o raquitismo, no qual os ossos são fracos e malformados (ver Figura 10-20b). ■

**Hormônios retinoides** Os retinoides são hormônios potentes que regulam o crescimento, a sobrevivência e a diferenciação das células via receptores nucleares. O pró-hormônio retinol é sintetizado a partir do β-caroteno, principalmente no fígado (ver Figura 10-21), e muitos tecidos convertem o retinol no hormônio ácido retinoico (AR).

Todos os tecidos são alvo dos retinoides, pois todos os tipos celulares têm pelo menos uma forma de receptor retinoide nuclear. Nos adultos, os alvos mais significativos são as córneas, a pele, o epitélio dos pulmões e da traqueia e o sistema imune, em todos os tecidos nos quais existe reposição contínua de células. O ácido retinoico regula a síntese de proteínas essenciais para o crescimento ou para a diferenciação. Vitamina A em excesso (o precursor dos hormônios retinoides) pode causar defeitos de nascença, e mulheres grávidas são orientadas a não usar os cremes com retinoides desenvolvidos para o tratamento de casos graves de acne. ■

**Hormônios da tireoide** Os hormônios da tireoide $T_4$ (tiroxina) e $T_3$ (tri-iodotironina) são sintetizados a partir da proteína precursora tireoglobulina ($M_r$ 660.000). Até 20 resíduos de Tyr na proteína são iodinados enzimaticamente na glândula tireoide, e dois resíduos de iodotirosina são então condensados para formar o precursor da tiroxina. Quando necessário, a tiroxina é liberada por proteólise. A condensação da monoiodotirosina com a di-iodotironina produz $T_3$, que também é um hormônio ativo liberado por proteólise.

Os hormônios tireoideos agem por meio de receptores nucleares e estimulam o metabolismo energético, especialmente no fígado e no músculo, aumentando a expressão de genes que codificam enzimas-chave catabólicas.

**Óxido nítrico ($NO^{\bullet}$)** O óxido nítrico é um radical livre relativamente estável, sintetizado a partir do oxigênio molecular e do nitrogênio guanidínico da arginina (ver Figura 22-33), em uma reação catalisada pela **NO-sintase.**

$$\text{Arginina} + 1\tfrac{1}{2}\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \longrightarrow \text{NO}^{\bullet} + \text{citrulina} + 2\text{H}_2\text{O} + 1\tfrac{1}{2}\text{NADP}^+$$

Esta enzima é encontrada em muitos tecidos e tipos celulares: neurônios, macrófagos, hepatócitos, miócitos do músculo liso, células endoteliais dos vasos sanguíneos e células epiteliais do rim. O NO age próximo de seu local de liberação, entrando na célula-alvo e ativando a enzima citosólica guanilato-ciclase, que catalisa a formação do segundo mensageiro cGMP (ver Figura 12-20). Uma proteína-cinase dependente de cGMP controla os efeitos do NO pela fosforilação de proteínas-chave e pela consequente alteração de suas atividades. A fosforilação das proteínas contráteis da musculatura lisa que envolve os vasos sanguíneos, por exemplo, relaxa o músculo, reduzindo a pressão sanguínea.

## A liberação de hormônios é regulada por uma hierarquia de sinais neuronais e hormonais

Os níveis alterados de hormônios específicos regulam processos celulares específicos, mas o que regula o nível de cada hormônio? A resposta simples é que o sistema nervoso central recebe informações vindas de muitos sensores externos e internos – por exemplo, sinais sobre perigo, fome, alimento ingerido, composição e pressão sanguínea – e coordena a produção de sinais hormonais adequados pelos tecidos endócrinos. Para uma resposta mais completa, é preciso considerar os sistemas produtores de hormônios do corpo humano e algumas de suas inter-relações funcionais.

A **Figura 23-6** mostra a posição anatômica das principais glândulas endócrinas em humanos, e a **Figura 23-7** mostra a "cadeia de comando" na hierarquia da sinalização

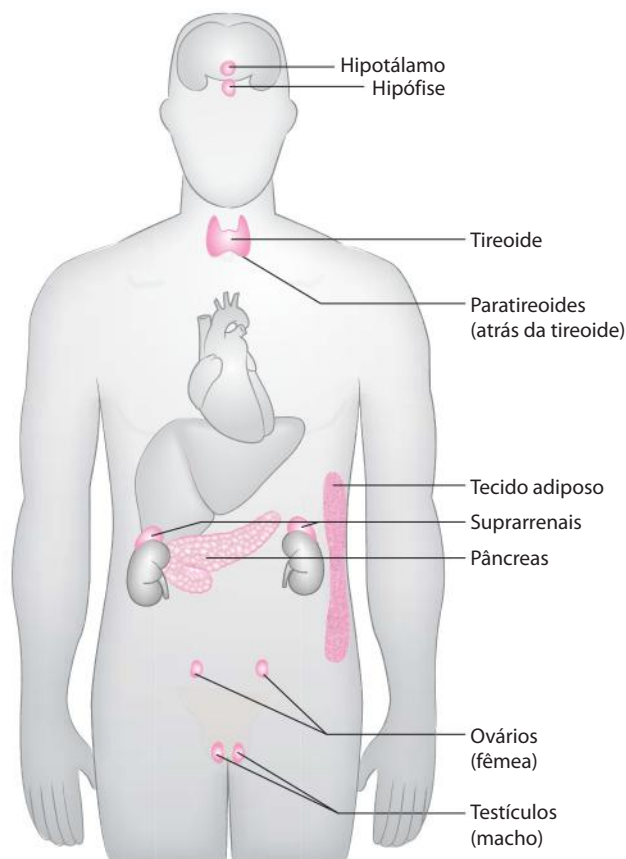



**FIGURA 23-6 As principais glândulas endócrinas.** As glândulas estão sombreadas em cor-de-rosa.

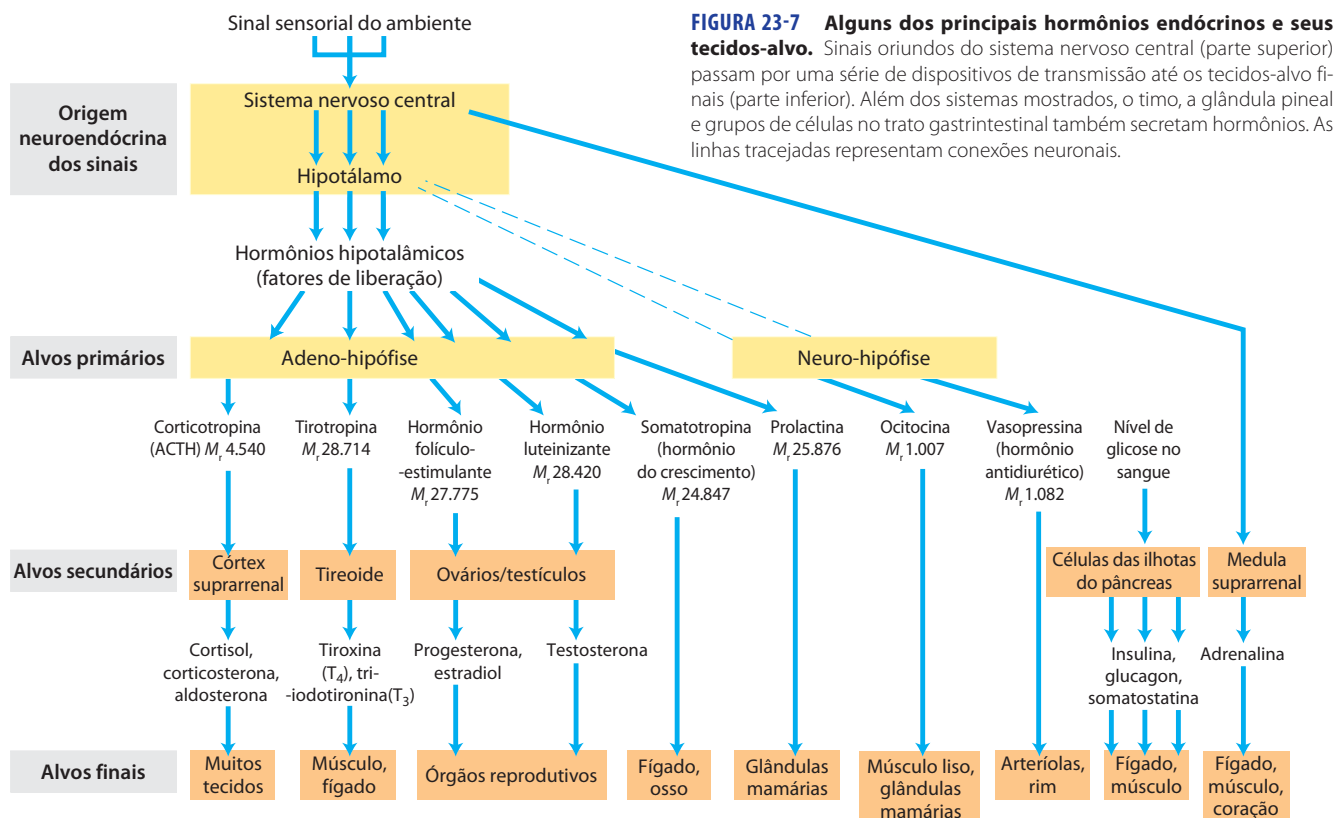



**FIGURA 23-7 Alguns dos principais hormônios endócrinos e seus tecidos-alvo.** Sinais oriundos do sistema nervoso central (parte superior) passam por uma série de dispositivos de transmissão até os tecidos-alvo finais (parte inferior). Além dos sistemas mostrados, o timo, a glândula pineal e grupos de células no trato gastrintestinal também secretam hormônios. As linhas tracejadas representam conexões neuronais.

hormonal. O **hipotálamo**, pequena região do cérebro (**Figura 23-8**), é o centro de coordenação do sistema endócrino; ele recebe e integra as mensagens do sistema nervoso central. Em resposta a essas mensagens, o hipotálamo produz hormônios reguladores (fatores de liberação) que passam diretamente para a glândula hipófise próxima a ele, por meio de vasos sanguíneos especiais e neurônios que conectam as duas glândulas (Figura 23-8b). A glândula hipófise tem duas partes funcionalmente distintas. A **neuro-hipófise** contém os terminais axonais de muitos neurônios que se originam no hipotálamo. Esses neurônios produzem os pequenos hormônios peptídicos ocitocina e vasopressina (**Figura 23-9**), que se deslocam pelo axônio até os terminais nervosos na hipófise, onde são armazenados em grânulos secretores e aguardam o sinal para sua liberação.

A **adeno-hipófise** responde aos hormônios hipotalâmicos transportados pelo sangue, produzindo **hormônios trópicos**, ou **tropinas** (do grego, *tropos* = "voltar-se para"). Esses peptídeos relativamente longos ativam a próxima classe de glândulas endócrinas (Figura 23-7), incluindo o córtex suprarrenal, a glândula tireoide, os ovários e os testículos. Essas glândulas, por sua vez, secretam seus hormônios específicos, que são transportados pela corrente sanguínea para os tecidos-alvo. Por exemplo, o hormônio liberador de corticotropina secretado pelo hipotálamo estimula a adeno-hipófise a liberar ACTH, que viaja pelo sangue para a zona fasciculada do córtex suprarrenal e desencadeia a liberação de cortisol. Este, que é o último hormônio nessa cascata, age por meio de seu receptor em muitos tipos de células-alvo e altera o metabolismo celular. Nos hepatócitos, um dos efeitos do cortisol é o aumento da taxa de gliconeogênese.

As cascatas hormonais como aquelas responsáveis pela liberação de cortisol e adrenalina resultam em grande amplificação do sinal inicial e permitem um requintado ajuste fino do sinal do hormônio final (**Figura 23-10**). Em cada nível na cascata, um sinal pequeno provoca uma resposta maior. Por exemplo, o sinal elétrico inicial para o hipotálamo resulta na liberação de poucos *nanogramas* de hormônio liberador de corticotropina, o qual provoca a liberação de uns poucos *microgramas* de corticotropina. A corticotropina atua sobre o córtex suprarrenal, causando a liberação de *miligramas* de cortisol, uma amplificação total de pelo menos um milhão de vezes.

Em cada nível da cascata hormonal, é possível uma retroalimentação negativa das etapas prévias; um nível desnecessariamente elevado do último hormônio ou de um intermediário inibe a liberação dos hormônios anteriores na cascata. Esses mecanismos de retroalimentação cumprem a mesma finalidade daqueles que limitam o produto de uma via biossintética (compare a Figura 23-10 com a Figura 22-37): um produto é sintetizado (ou liberado) somente até que seja alcançada a concentração necessária.

## RESUMO 23.1 Hormônios: estruturas diferentes para funções diferentes

- Os hormônios são mensageiros químicos secretados por determinados tecidos para o sangue ou para o fluido intersticial, servindo para regular a atividade de outras células ou tecidos.

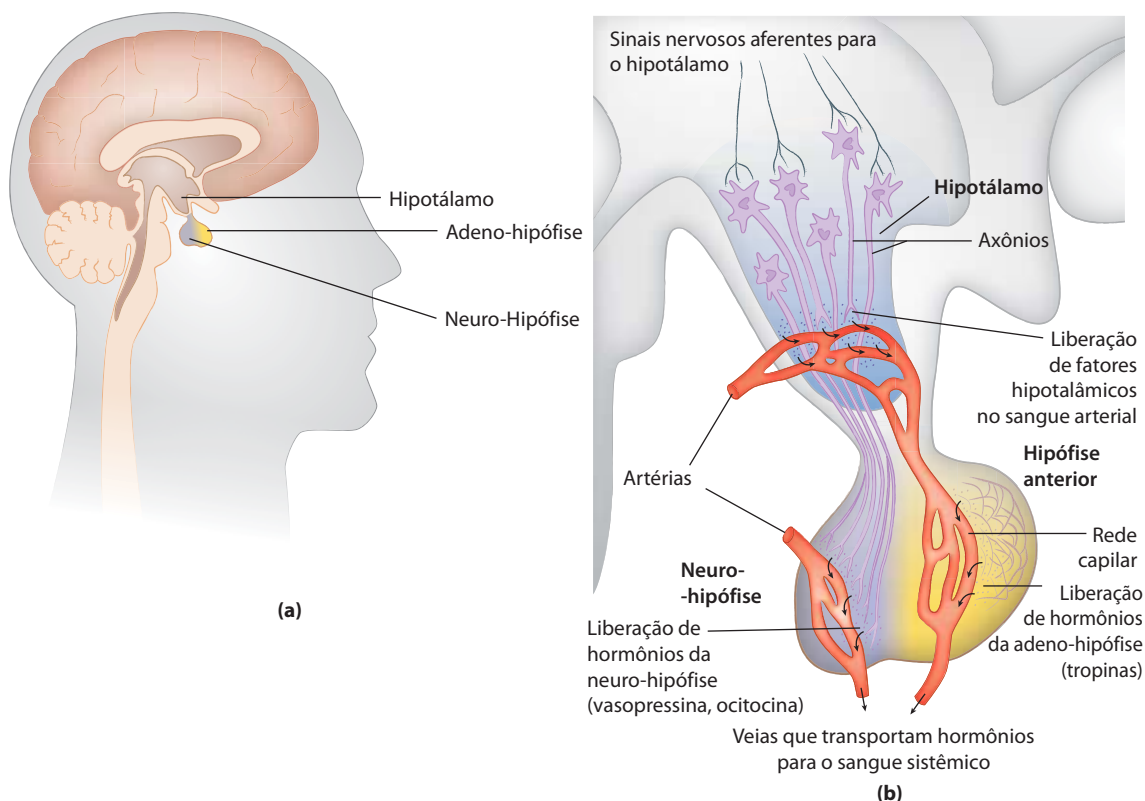



**FIGURA 23-8 Origem neuroendócrina dos sinais hormonais. (a)** Localização do hipotálamo e da glândula hipófise. **(b)** Detalhes do sistema hipotálamo-hipófise. Os sinais dos neurônios aferentes estimulam o hipotálamo a secretar fatores de liberação para um vaso sanguíneo que transporta os hormônios diretamente para uma rede de capilares na adeno-hipófise. Em resposta a cada fator de liberação hipotalâmico, a adeno-hipófise libera na circulação geral o hormônio apropriado. Os hormônios da neuro-hipófise são sintetizados em neurônios que se originam no hipotálamo, transportados ao longo dos axônios para os terminais nervosos na neuro-hipófise e ali armazenados até serem liberados no sangue em resposta a um sinal neuronal.

- Radioimunoensaio e Elisa são duas técnicas muito sensíveis para a detecção e a quantificação de hormônios.
- Hormônios peptídicos, catecolaminas e eicosanoides se ligam a receptores específicos na membrana plasmática de células-alvo, alterando o nível de um segundo mensageiro intracelular, sem entrarem na célula.
- Os hormônios esteroides, a vitamina D, os retinoides e os hormônios tireoideos entram nas células-alvo e alteram a expressão gênica, interagindo com receptores nucleares específicos.
- Alguns hormônios são sintetizados como pró-hormônios e ativados por clivagem enzimática. Em alguns casos, como no da insulina, um único hormônio é produzido por clivagem proteolítica; em outros, como na POMC, são produzidos vários hormônios por clivagem de um único pró-hormônio.
- Os hormônios são regulados por uma hierarquia de interações entre o cérebro e as glândulas endócrinas: os impulsos nervosos estimulam o hipotálamo a enviar hormônios específicos para a glândula hipófise, estimulando (ou inibindo) a liberação de hormônios trópicos. Os hormônios da adeno-hipófise, por sua vez, estimu-

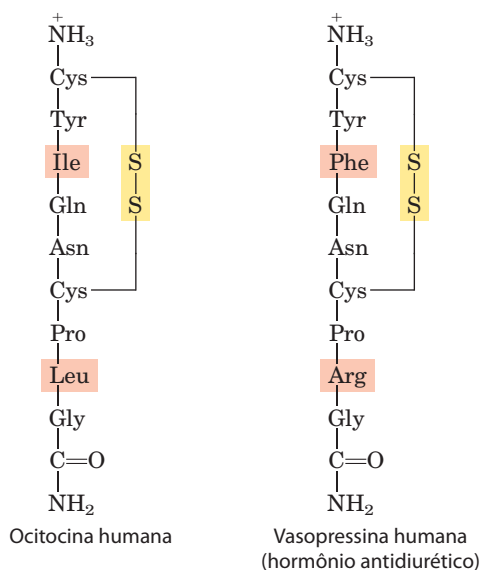



**FIGURA 23-9 Dois hormônios da glândula neuro-hipófise.** O resíduo carboxiterminal de ambos os peptídeos é a glicinamida, —NH—$CH_2$—$CONH_2$ (conforme observado na Figura 23-2, a amidação da extremidade carboxil é comum em hormônios peptídicos pequenos). Estes dois hormônios, que diferem somente em dois resíduos (sombreados em cor salmão), têm efeitos biológicos muito diferentes. A ocitocina age na musculatura lisa do útero e das glândulas mamárias, causando contração uterina durante o trabalho de parto e promovendo a liberação do leite durante a lactação. A vasopressina (também chamada de hormônio antidiurético) aumenta a reabsorção de água pelos rins e promove a constrição dos vasos sanguíneos, aumentando a pressão sanguínea.

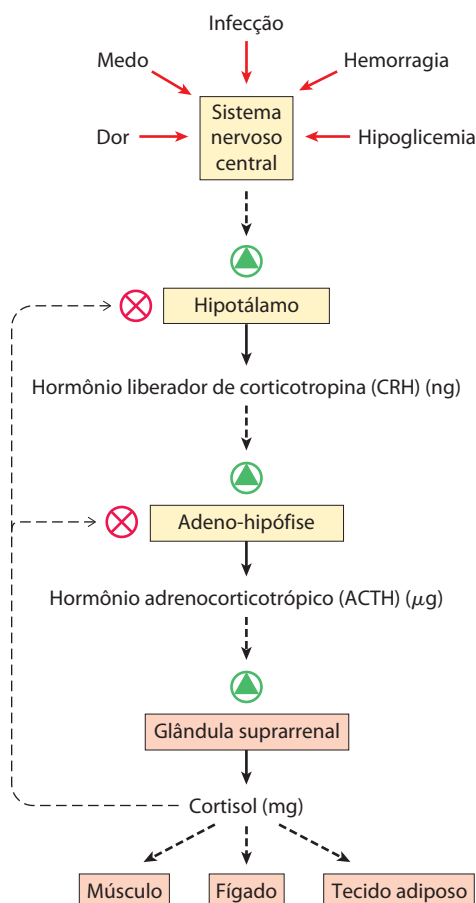



**FIGURA 23-10 Cascata de liberação de hormônios em consequência da estimulação do hipotálamo pelo sistema nervoso central.** As setas pretas sólidas indicam a ação dos hormônios sobre os tecidos-alvo. Em cada tecido endócrino ao longo da via, é recebido um estímulo a partir do nível superior, o qual é amplificado e transduzido na liberação do hormônio seguinte na cascata. A cascata é sensível à regulação em vários níveis por meio de retroalimentação negativa (setas finas e tracejadas) pelo último hormônio (neste caso, cortisol). Desta forma, o produto regula sua própria produção, como na retroalimentação negativa das vias biossintéticas em uma célula individual.

lam outras glândulas endócrinas (tireoide, suprarrenais, pâncreas) a secretar seus hormônios característicos, que, por sua vez, estimulam tecidos-alvo específicos.

- As cascatas hormonais, nas quais catalisadores ativam catalisadores, amplificam o estímulo inicial em várias ordens de grandeza, frequentemente em um tempo muito curto (segundos).

## 23.2 Metabolismo específico para cada tecido: a divisão de trabalho

Cada tecido do corpo humano tem uma função especializada, que se reflete na sua anatomia e atividade metabólica (**Figura 23-11**). O músculo esquelético permite o movimento direcionado; o tecido adiposo armazena e distribui energia na forma de gordura, a qual serve como combustível para todo o corpo bem como isolamento térmico; no cérebro, as células bombeiam íons através de suas membranas plasmáticas para produzir sinais elétricos. O fígado tem um papel central de processamento e distribuição no metabolismo e abastece todos os outros órgãos e tecidos com a mistura apropriada de nutrientes via corrente sanguínea. A posição central da função hepática é indicada pela referência comum que se faz a todos os outros tecidos e órgãos como "extra-hepáticos". Por essa razão, a presente discussão começa sobre a divisão do trabalho metabólico levando em conta as transformações de carboidratos, aminoácidos e gorduras no fígado dos mamíferos. Em seguida, é feita uma breve descrição das principais funções metabólicas do tecido adiposo, do músculo, do cérebro e do meio que os interconecta: o sangue.

### O fígado processa e distribui os nutrientes

Durante a digestão nos mamíferos, as três classes principais de nutrientes (carboidratos, proteínas e gorduras) sofrem hidrólise enzimática em seus constituintes mais simples. Essa degradação é necessária porque as células epiteliais que revestem o lúmen intestinal absorvem somente moléculas relativamente pequenas. Muitos dos ácidos graxos e dos monoacilgliceróis liberados pela digestão das gorduras no intestino são reunidos na forma de triacilgliceróis (TAG) dentro dessas células epiteliais.

Após serem absorvidos, muitos açúcares e aminoácidos, assim como alguns TAG reconstituídos, passam das células do epitélio intestinal para os capilares sanguíneos, sendo transportados para o fígado pela corrente sanguínea; os TAG restantes vão para o tecido adiposo via sistema linfático. A veia porta (Figura 23-11) é uma via direta dos órgãos digestivos para o fígado, e, por isso, esse órgão é o primeiro a ter acesso aos nutrientes ingeridos. O fígado tem dois tipos celulares principais. As células de Kupffer são fagócitos, importantes na função imunológica. Os **hepatócitos**, de maior interesse neste capítulo, transformam os nutrientes da dieta em combustíveis e precursores necessários para outros tecidos, e os exportam pelo sangue. O tipo e a quantidade de nutrientes fornecidos para o fígado variam com diversos fatores, incluindo a dieta e o intervalo entre as refeições. A demanda dos tecidos extra-hepáticos por combustíveis e precursores varia entre os órgãos e com o nível de atividade e o estado nutricional geral do indivíduo.

Para satisfazer essas condições variáveis, o fígado tem uma notável flexibilidade metabólica. Por exemplo, quando a dieta é rica em proteína, os hepatócitos se abastecem com altos níveis de enzimas para o catabolismo dos aminoácidos e a gliconeogênese. Algumas horas após uma mudança para uma dieta rica em carboidratos, os níveis dessas enzimas começam a diminuir, e os hepatócitos aumentam a síntese de enzimas essenciais para o metabolismo de carboidratos e para a síntese de gorduras. As enzimas hepáticas apresentam uma taxa de renovação (são sintetizadas e degradadas) de 5 a 10 vezes maior que a da renovação de enzimas de outros tecidos, como o músculo. Os tecidos extra-hepáticos também podem ajustar seu metabolismo para condições predominantes, mas nenhum é tão adaptável quanto o fígado e nenhum é tão fundamental para o metabolismo total do organismo. A seguir é apresentada uma visão geral dos destinos possíveis para açúcares, aminoácidos e lipídeos que entram no fígado a partir da corrente sanguínea. Para ajudá-lo a recordar as

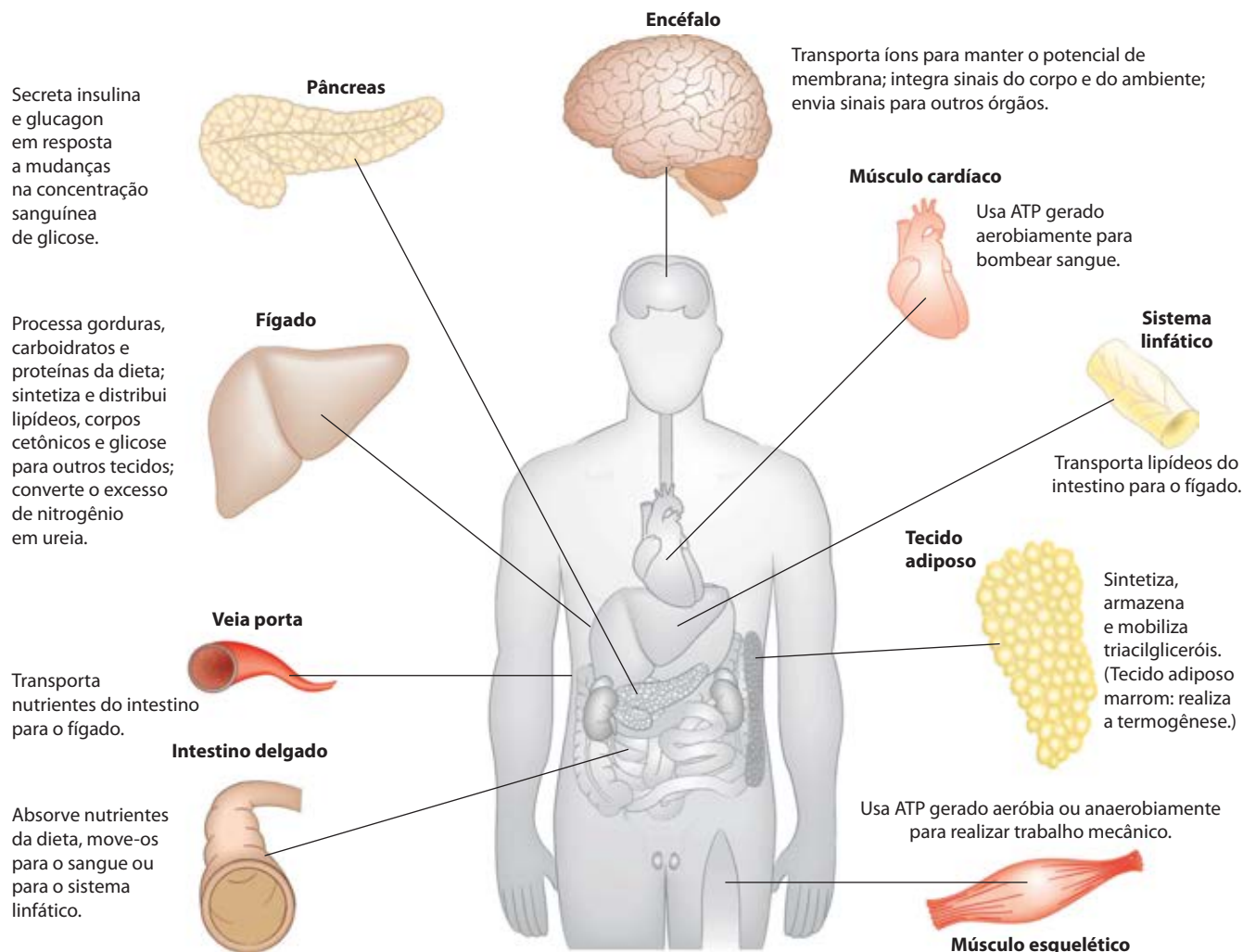



**FIGURA 23-11** **Funções metabólicas especializadas dos tecidos dos mamíferos.**

transformações metabólicas discutidas aqui, a Tabela 23-2 mostra as principais vias e processos e indica, pelo número da figura, onde cada via está apresentada em detalhes. Aqui, são fornecidos resumos das vias, indicando as vias numeradas e as reações nas Figuras 23-12 a 23-14.

**Açúcares** O transportador de glicose dos hepatócitos (GLUT2) permite difusão passiva e rápida da glicose de forma que a concentração deste açúcar em um hepatócito é essencialmente a mesma daquela no sangue. A glicose que entra nos hepatócitos é fosforilada pela hexocinase IV (glicocinase) para gerar glicose-6-fosfato. A glicocinase tem um $K_m$ para a glicose muito mais alto (10 mM), quando comparado com o das isoenzimas hexocinases em outras células (p. 603), e, ao contrário dessas isoenzimas, não é inibida por seu produto, a glicose-6-fosfato. A presença da glicocinase permite aos hepatócitos continuar fosforilando a glicose quando sua concentração se eleva muito acima dos níveis que sobrecarregariam outras hexocinases. O alto $K_m$ para a glicocinase também garante que a fosforilação da glicose nos hepatócitos seja mínima quando a concentração do açúcar é baixa, prevenindo seu consumo via glicólise pelo fígado, como combustível. Isso poupa glicose para outros tecidos. A frutose, a galactose e a manose, todas absorvidas a partir do intestino delgado, também são convertidas em glicose-6-fosfato pelas vias enzimáticas descritas no Capítulo 14. A glicose-6-fosfato está no cruzamento do metabolismo dos carboidratos no fígado. Ela pode entrar em qualquer de várias vias metabólicas importantes (**Figura 23-12**), dependendo das necessidades metabólicas do organismo. Pela ação de várias enzimas reguladas alostericamente, e por meio de regulação hormonal da síntese e da atividade de enzimas, o fígado direciona o fluxo de glicose para uma ou mais dessas vias.

❶ A glicose-6-fosfato é desfosforilada pela glicose-6-fosfatase para gerar glicose livre (ver Figura 15-30), exportada para repor a glicose sanguínea. A exportação é a via predominante quando o estoque de glicose-6-fosfato é limitado, porque a concentração da glicose no sangue deve ser mantida suficientemente alta (4 mM) para fornecer energia adequada para o cérebro e outros tecidos. ❷ A glicose-6-fosfato não imediatamente necessária para manter a glicemia é convertida em glicogênio hepático ou direcionada para um de vários outros destinos. Seguindo a glicólise e a reação da piruvato-desidrogenase, ❸ a acetil-CoA formada pode ser

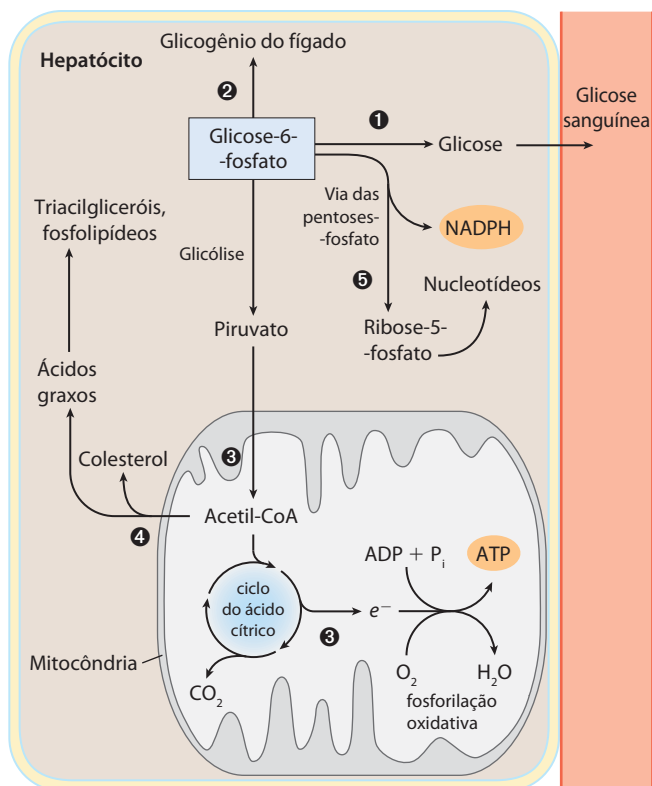



**FIGURA 23-12 Vias metabólicas para a glicose-6-fosfato no fígado.** Nas Figuras 23-13, 23-14 e nesta, as vias anabólicas são representadas na ascendente, as vias catabólicas na descendente, e a distribuição para outros órgãos na horizontal. Os processos numerados em cada figura estão descritos no texto.

oxidada para a produção de ATP no ciclo do ácido cítrico, com a transferência de elétrons e a fosforilação oxidativa decorrentes gerando ATP. (Normalmente, contudo, os ácidos graxos são o combustível preferido para a produção de ATP nos hepatócitos.) ❹ A acetil-CoA também pode servir como precursora dos ácidos graxos, que são incorporados em TAG e fosfolipídeos, e do colesterol. Grande quantidade dos lipídeos sintetizados no fígado é transportada pelas lipoproteínas sanguíneas para outros tecidos. ❺ A glicose-6-fosfato pode, alternativamente, entrar na via das pentoses-fosfato, gerando poder redutor (NADPH) necessário para a biossíntese de ácidos graxos e colesterol, e D-ribose-5-fosfato, precursor para a síntese de nucleotídeos. O NADPH também é um cofator essencial na destoxificação e eliminação de muitos fármacos e outros xenobióticos metabolizados no fígado.

**Aminoácidos** Os aminoácidos que chegam ao fígado seguem várias vias metabólicas importantes (**Figura 23-13**). ❶ São precursores para a síntese proteica, processo discutido no Capítulo 27. O fígado repõe constantemente suas proteínas, que têm uma taxa de renovação relativamente alta (meia-vida média de horas a dias), sendo também o local de biossíntese da maioria das proteínas plasmáticas. ❷ Alternativamente, os aminoácidos passam via corrente sanguínea para outros órgãos, onde são usados na síntese das proteínas teciduais. ❸ Outros aminoácidos são precursores na biossíntese de nucleotídeos, hormônios e outros compostos nitrogenados no fígado e em outros tecidos.

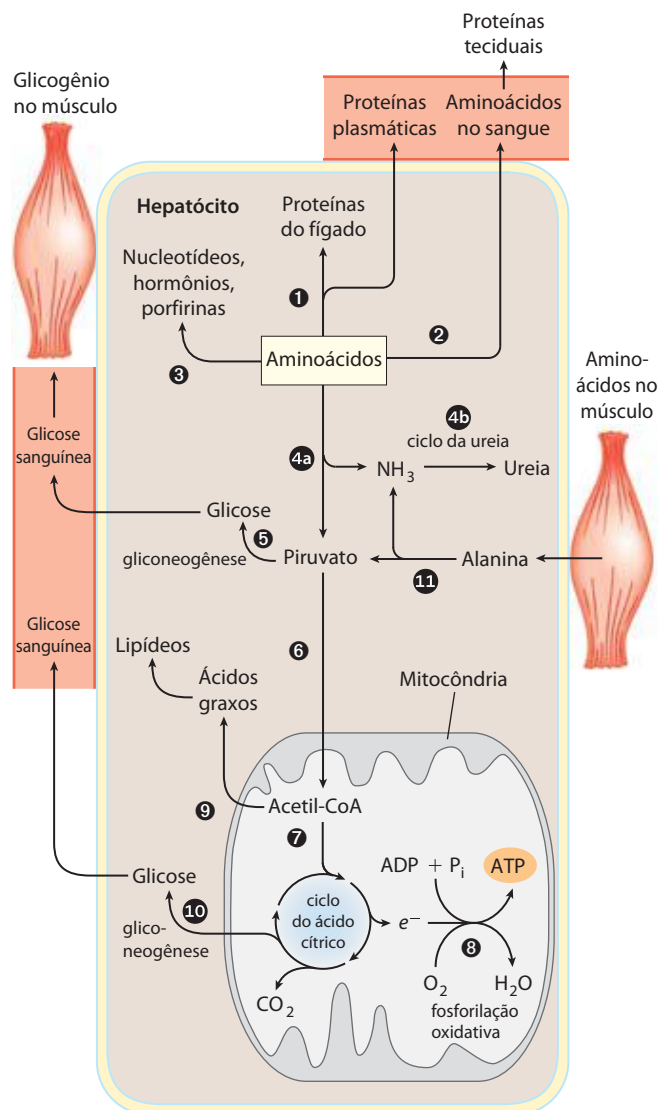



**FIGURA 23-13 Metabolismo dos aminoácidos no fígado.**

❹a Os aminoácidos não utilizados como precursores biossintéticos são transaminados ou desaminados e degradados para gerar piruvato e intermediários do ciclo do ácido cítrico, com vários destinos; ❹b a amônia liberada é convertida em ureia, um produto de excreção. ❺ O piruvato pode ser convertido em glicose e glicogênio pela gliconeogênese, ou ❻ pode ser convertido em acetil-CoA, que tem vários destinos possíveis: ❼ oxidação via ciclo do ácido cítrico e ❽ fosforilação oxidativa para produzir ATP, ou ❾ conversão em lipídeos para armazenamento. ❿ Os intermediários do ciclo do ácido cítrico podem ser desviados para a síntese de glicose pela gliconeogênese.

O fígado também metaboliza os aminoácidos que provêm intermitentemente de outros tecidos. O sangue é suprido adequadamente com glicose logo após a digestão e a absorção dos carboidratos da dieta ou, entre as refeições, pela conversão do glicogênio hepático em glicose sanguínea. Durante o intervalo entre as refeições, especialmente se for prolongado, algumas proteínas musculares são degradadas em aminoácidos, que doam seus grupos amino (por

**TABELA 23-2** Vias do metabolismo de carboidratos, aminoácidos e gorduras ilustradas nos capítulos anteriores

| Via | Figura de referência |
|---|---|
| *Ciclo do ácido cítrico:* acetil-CoA ⟶ $2CO_2$ | 16-7 |
| *Fosforilação oxidativa:* síntese de ATP | 19-19 |
| **Catabolismo de carboidratos** | |
| *Glicogenólise:* glicogênio ⟶ glicose-1-fosfato ⟶ glicose sanguínea | 15-27; 15-28 |
| *Entrada de hexoses na glicólise:* frutose, manose, galactose ⟶ glicose-6-fosfato | 14-11 |
| *Glicólise:* glicose → piruvato | 14-2 |
| *Reação da piruvato-desidrogenase:* piruvato → acetil-CoA | 16-2 |
| *Fermentação láctica:* glicose ⟶ lactato + 2ATP | 14-4 |
| *Via das pentoses-fosfato:* glicose-6-fosfato ⟶ pentoses-fosfato + NADPH | 14-22 |
| **Anabolismo de carboidratos** | |
| *Gliconeogênese:* intermediários do ciclo do ácido cítrico ⟶ glicose | 14-17 |
| *Ciclo da glicose-alanina:* glicose ⟶ piruvato ⟶ alanina ⟶ glicose | 18-9 |
| *Síntese de glicogênio:* glicose-6-fosfato ⟶ glicose-1-fosfato ⟶ glicogênio | 15-32 |
| **Metabolismo de aminoácidos e nucleotídeos** | |
| *Degradação de aminoácidos:* aminoácidos ⟶ acetil-CoA, intermediários do ciclo do ácido cítrico | 18-15 |
| *Síntese de aminoácidos* | 22-11 |
| *Ciclo da ureia:* $NH_3$ ⟶ ureia | 18-10 |
| *Ciclo da glicose-alanina:* alanina → glicose | 18-9 |
| *Síntese de nucleotídeos:* aminoácidos ⟶ purinas, pirimidinas | 22-35; 22-38 |
| Síntese de hormônios e neurotransmissores | 22-31 |
| **Catabolismo de gorduras** | |
| *β-Oxidação de ácidos graxos:* ácido graxo ⟶ acetil-CoA | 17-8 |
| *Oxidação de corpos cetônicos:* β-hidroxibutirato ⟶ acetil-CoA ⟶ $CO_2$ via ciclo do ácido cítrico | 17-20 |
| **Anabolismo de gorduras** | |
| *Síntese de ácidos graxos:* acetil-CoA ⟶ ácidos graxos | 21-6 |
| *Síntese de triacilglicerol:* acetil-CoA ⟶ ácidos graxos ⟶ triacilglicerol | 21-18; 21-19 |
| *Formação de corpos cetônicos:* acetil-CoA ⟶ acetoacetato, β-hidroxibutirato | 17-19 |
| *Síntese de colesterol e ésteres de colesteril:* acetil-CoA ⟶ colesterol ⟶ ésteres de colesteril | 21-33 a 21-37 |
| *Síntese de fosfolipídeos:* ácidos graxos ⟶ fosfolipídeos | 21-17; 21-23 a 21-28 |

transaminação) para o piruvato, o produto da glicólise, formando alanina, que ⓫ é transportada para o fígado e desaminada. Os hepatócitos convertem o piruvato resultante em glicose sanguínea (via gliconeogênese ❺), e a amônia em ureia para excreção ❹b. Uma vantagem deste ciclo glicose-alanina (ver Figura 18-9) é amenizar flutuações nos níveis de glicose sanguínea nos intervalos entre as refeições. O déficit de aminoácidos imposto aos músculos é suprido após a próxima refeição pelos aminoácidos da dieta.

**Lipídeos** Os ácidos graxos componentes dos lipídeos que chegam aos hepatócitos também têm vários destinos (**Figura 23-14**). ❶ Alguns são convertidos em lipídeos hepáticos. ❷ Na maior parte das vezes, os ácidos graxos são o principal combustível oxidativo no fígado. Ácidos graxos livres podem ser ativados e oxidados para gerar acetil-CoA e NADH. ❸ A acetil-CoA é posteriormente oxidada no ciclo do ácido cítrico, e ❹ as oxidações no ciclo promovem a síntese de ATP por fosforilação oxidativa. ❺ O excesso de acetil-CoA, não requerido pelo fígado, é convertido em acetoacetato e β-hidroxibutirato; esses corpos cetônicos circulam pelo sangue para outros tecidos, para serem usados como combustível para o ciclo do ácido cítrico. Os corpos cetônicos, ao contrário dos ácidos graxos, podem atravessar a barreira sangue-cérebro, fornecendo ao cérebro uma fonte de acetil-CoA para oxidação geradora de energia. Os corpos cetônicos podem suprir uma fração significativa da energia em alguns tecidos extra-hepáticos – até um terço no coração, e em torno de 60 a 70% no cérebro durante jejum prolongado. ❻ Uma parte da acetil-CoA derivada dos ácidos graxos (e da glicose) é usada na biossíntese de colesterol, que é ne-

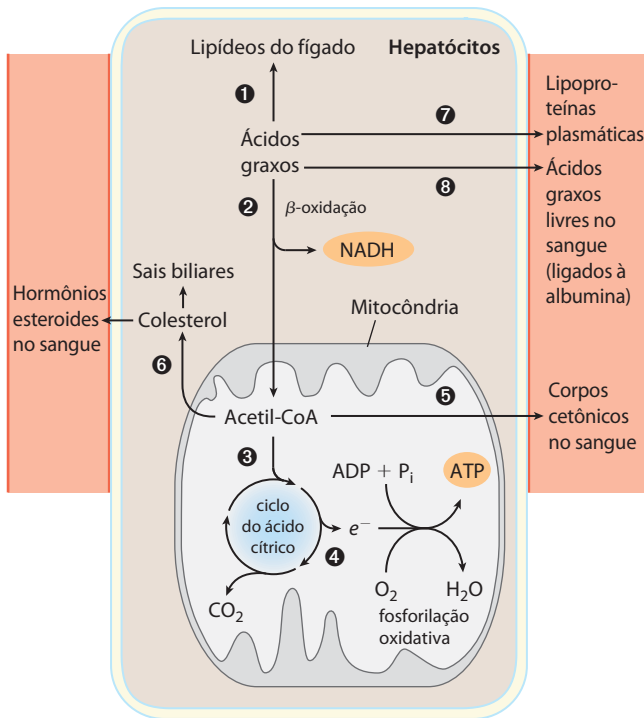



**FIGURA 23-14** **Metabolismo dos ácidos graxos no fígado.**

**FIGURA 23-15** **Adipócitos de tecido adiposo branco e marrom.** Visão esquemática de adipócitos de camundongo de **(a)** tecido adiposo branco (TAB) e **(b)** tecido adiposo marrom (TAM). Os adipócitos brancos são maiores e têm uma única gota lipídica enorme, que comprime as mitocôndrias e o núcleo contra a membrana plasmática. Nos adipócitos marrons, as mitocôndrias são muito mais proeminentes, o núcleo está próximo ao centro da célula, e estão presentes múltiplas gotículas lipídicas. Na parte inferior, estão mostradas as micrografias eletrônicas de varredura dos adipócitos em **(c)** TAB e **(d)** TAM. No tecido adiposo, os capilares e as fibras de colágeno formam uma rede de suporte ao redor dos adipócitos esféricos.

cessário para síntese de membranas. O colesterol também é o precursor de todos os hormônios esteroides e dos sais biliares, essenciais para a digestão e a absorção de lipídeos.

Os outros dois destinos metabólicos dos lipídeos envolvem mecanismos especializados para o transporte de lipídeos insolúveis pelo sangue. ❼ Os ácidos graxos são convertidos em fosfolipídeos e TAG de lipoproteínas plasmáticas, que transportam os lipídeos para o tecido adiposo para serem armazenados. ❽ Alguns ácidos graxos livres são ligados à albumina sérica e transportados para o coração e para os músculos esqueléticos, que os captam e oxidam como um importante combustível. A albumina é a proteína plasmática mais abundante; uma molécula pode transportar até 10 moléculas de ácidos graxos livres.

O fígado funciona, assim, como o centro de distribuição do organismo, exportando nutrientes nas proporções corretas para outros órgãos, reduzindo as flutuações no metabolismo causadas pela ingestão intermitente de alimento e processando o excesso de grupos amino em ureia e outros produtos para serem eliminados pelos rins. Determinados nutrientes são armazenados no fígado, entre eles íons ferro e vitamina A. O fígado também destoxifica compostos orgânicos estranhos, como fármacos, aditivos e conservantes alimentares, e outros agentes potencialmente perigosos e sem valor nutricional. Muitas vezes, a destoxificação envolve a hidroxilação dependente do citocromo P-450 de compostos orgânicos relativamente insolúveis, tornando-os solúveis o suficiente para posterior degradação e excreção (ver Quadro 21-1).

## O tecido adiposo armazena e provê ácidos graxos

Existem dois tipos distintos de tecido adiposo, o branco e o marrom (**Figura 23-15**), os quais apresentam funções bastante diferentes. Primeiro será estudado o mais abundante dos dois. O **tecido adiposo branco** (**TAB**) é amorfo e amplamente distribuído pelo corpo: sob a pele, ao redor dos vasos sanguíneos mais profundos e na cavidade abdominal. Os **adipócitos** do TAB são células grandes (30 a 70 $\mu$m de diâmetro), esféricas, totalmente preenchidas com uma única e grande gota lipídica de triacilgliceróis, a qual constitui 65% da massa celular e comprime as mitocôndrias e o núcleo em uma fina camada contra a membrana plasmática (Figura 23-15a, c). Em humanos, o TAB compõe cerca de 15% da massa de um adulto jovem saudável. Os adipócitos são metabolicamente muito ativos, respondendo rapidamente a estímulos hormonais em uma interação metabólica com o fígado, o músculo esquelético e o coração.

Como outros tipos celulares, os adipócitos têm um metabolismo glicolítico ativo, oxidam piruvato e ácidos graxos pelo ciclo do ácido cítrico e realizam fosforilação oxidativa. Durante períodos de captação elevada de carboidratos, o tecido adiposo pode converter a glicose (via piruvato e acetil-CoA) em ácidos graxos e converter esses últimos em TAG armazenados em grandes glóbulos de gordura – embora a maior parte da síntese de ácidos graxos em humanos ocorra nos hepatócitos. Os adipócitos armazenam os TAG que vêm do fígado (transportados no sangue como VLDL; ver Figura 21-40) e do trato intestinal (transportados em quilomicra), particularmente após uma refeição rica em gordura.

Quando aumenta a demanda por combustível (por exemplo, entre as refeições), as lipases dos adipócitos hidrolisam os triacilgliceróis armazenados, liberando ácidos graxos livres, que podem se deslocar pela corrente sanguínea para o músculo esquelético e o coração. A liberação dos ácidos graxos dos adipócitos é aumentada pela adrenalina, que estimula a fosforilação dependente de cAMP da perilipina e, assim, dá às lipases específicas para tri-, di-, e monoglicerídeos acesso aos triacilgliceróis na gota lipídica (ver Figura 17-3). A lipase sensível a hormônio também é estimulada por fosforilação, mas esta não é a principal causa do aumento da lipólise. A insulina contrabalança o efeito da adrenalina, reduzindo a atividade da lipase.

A degradação e a síntese de triacilgliceróis no tecido adiposo constituem um ciclo de substrato; até 70% dos ácidos graxos liberados pelas três lipases são reesterificados nos adipócitos, produzindo novamente os triacilgliceróis. Recorde do Capítulo 15 que tais ciclos de substrato permitem uma regulação fina da velocidade e da direção do fluxo dos intermediários em uma via bidirecional. No tecido adiposo, o glicerol liberado pelas lipases dos adipócitos não pode ser reutilizado na síntese de triacilgliceróis, porque os adipócitos não têm a glicerol-cinase. Em vez disso, o glicerol-fosfato necessário para a síntese de TAG é obtido a partir do piruvato por gliceroneogênese, envolvendo a PEP-carboxicinase citosólica (ver Figura 21-22).

Além de sua função central como depósito de combustível, o tecido adiposo tem um importante papel como órgão endócrino, produzindo e liberando hormônios que sinalizam o estado das reservas de energia e coordenam o metabolismo das gorduras e dos carboidratos em todo o corpo. Adiante essa função será abordada, na parte sobre a regulação hormonal da massa corporal.

## O tecido adiposo marrom é termogênico

Nos vertebrados pequenos e nos animais hibernantes, uma proporção significativa do tecido adiposo é formada pelo **tecido adiposo marrom** (**TAM**), distinguido do TAB por seus adipócitos menores (20 a 40 $\mu$m de diâmetro) com formato diferente (poligonais, em vez de redondos) (Figura 23-15b, d). Como os adipócitos brancos, os marrons armazenam triacilgliceróis, mas em várias gotículas de lipídeo menores por célula em vez de uma única gota central. As células do TAM têm mais mitocôndrias e um suprimento mais rico de capilares e de inervação do que as células do TAB, e sua característica cor marrom é conferida pelos citocromos das mitocôndrias e pela hemoglobina nos capilares. Uma característica singular dos adipócitos marrons é a alta expressão do gene *UCP1*, que codifica a **termogenina**, a proteína desacopladora mitocondrial (ver Figura 19-36). A atividade dessa proteína é responsável por uma das principais funções do TAM: a **termogênese.**

Nos adipócitos marrons, os ácidos graxos armazenados nas gotículas de gordura são liberados, entram nas mitocôndrias e sofrem conversão completa em $CO_2$ pela $\beta$-oxidação e pelo ciclo do ácido cítrico. O $FADH_2$ e o NADH reduzidos gerados passam seus elétrons pela cadeia respiratória para o oxigênio molecular. No TAB, os prótons bombeados para fora da mitocôndria durante a transferência de elétrons reentram na matriz por meio da ATP-sintase, e a energia dessa transferência é conservada na síntese de ATP. No TAM, a termogenina proporciona uma via alternativa para a entrada dos prótons na matriz, que ignora a ATP-sintase; a energia do gradiente de prótons é assim dissipada na forma de calor, que mantém o corpo (especialmente o sistema nervoso e as vísceras) na sua temperatura ótima quando a temperatura ambiente estiver relativamente baixa.

No feto humano, a diferenciação dos fibroblastos "pré-adipócitos" em TAM começa na vigésima semana da gestação, e o TAM representa, no nascimento, de 1 a 5% da massa corporal total. Os depósitos de gordura marrom estão localizados onde o calor gerado pela termogênese garante que os tecidos vitais – vasos sanguíneos para a cabeça, principais vasos sanguíneos abdominais, e as vísceras, incluindo o pâncreas, as glândulas suprarrenais e os rins – não tenham sua temperatura reduzida quando o recém-nascido entra em um mundo de temperatura ambiente mais baixa (**Figura 23-16**).

Após o nascimento, o TAB começa a se desenvolver e o TAM começa a desaparecer. Os humanos adultos jovens têm depósitos muito diminuídos de TAM, de 3% de todo o tecido adiposo nos machos a 7% nas fêmeas, perfazendo menos de 0,1% da massa corporal. No entanto, os adultos aparentemente têm TAM que pode ser ativada por exposição ao frio e inibida pelo aumento da temperatura corporal (Figura 23-16b). Os adipócitos do TAM produzem calor pela oxidação de seus próprios ácidos graxos, mas eles captam e oxidam tanto ácidos graxos como glicose do sangue em taxas fora de proporção de suas massas. Na verdade, a detecção de TAM por tomografia de varredura por emissão de pósitrons (*PET scan*) depende da taxa relativamente alta de captação e metabolismo da *glicose* (Figura 23-16b). Humanos com feocromocitoma (tumores da glândula suprarrenal) produzem adrenalina e noradrenalina em excesso, e um dos efeitos é a diferenciação dos pré-adipócitos em regiões discretas de TAM, localizadas aproximadamente nos mesmos locais dos recém-nascidos. O fator de transcrição nuclear PPAR$\gamma$ (descrito mais adiante neste capítulo) tem um papel central na adaptação ao calor ou ao frio do ambiente, e na diferenciação normal do TAB e do TAM.

## Os músculos usam ATP para trabalho mecânico

O metabolismo das células da musculatura esquelética – **miócitos** – é especializado na geração de ATP como fonte imediata de energia para a contração. Além disso, o músculo esquelético está adaptado para realizar trabalho mecânico de forma intermitente, de acordo com a demanda. Às vezes, o músculo esquelético precisa trabalhar na sua capacidade máxima por um tempo curto, como em corridas de 100 metros; outras vezes, é necessário um esforço mais longo, como em maratonas ou trabalhos físicos mais prolongados.

Existem duas classes gerais de tecido muscular, que diferem no papel fisiológico e na utilização de combustível. O **músculo de contração lenta**, também chamado de músculo vermelho, proporciona tensão relativamente baixa, mas é altamente resistente à fadiga. Ele produz ATP pelo processo de fosforilação oxidativa, relativamente lento, mas estável. O músculo vermelho é muito rico em mitocôndrias e é irrigado por redes muito densas de vasos sanguíneos, que fornecem o oxigênio essencial para a produção de ATP. O **músculo de contração rápida**, ou músculo branco, tem

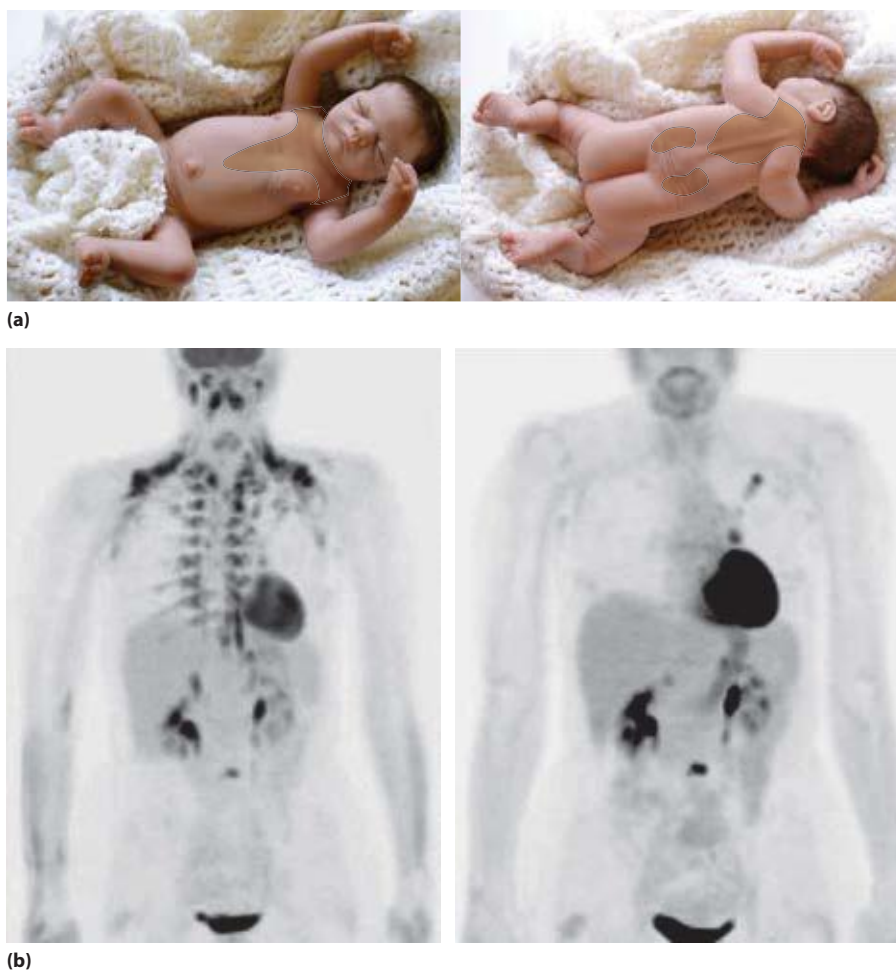



**FIGURA 23-16 Tecido adiposo marrom em crianças e adultos. (a)** Os bebês humanos, ao nascer, têm a gordura marrom distribuída conforme mostrado nesta figura, para proteger a coluna vertebral, os vasos sanguíneos principais e os órgãos internos. **(b)** *PET scan* de uma mulher de 45 anos injetada com $^{18}$F-desoxiglicose (para detectar tecidos que metabolizam glicose rapidamente; ver Figura 23-23) revela tumores no pulmão esquerdo e nos nodos linfáticos, na glândula suprarrenal direita e em uma vértebra lombar (esquerda). O coração e a bexiga também foram intensamente marcados conforme esperado, mas, além disso, havia uma surpreendente atividade metabólica nas regiões que normalmente têm gordura marrom nos bebês. Quando a mesma paciente foi aquecida por 48 horas antes da *PET scan* (direita), estas áreas de gordura marrom não se mostraram ativas, indicando que este adulto tem depósitos de gordura marrom, metabolicamente ativos somente quando a temperatura corporal está relativamente baixa.

menos mitocôndrias e um suprimento menor de vasos sanguíneos do que o músculo vermelho, mas pode desenvolver grande tensão e o faz mais rapidamente. O músculo branco entra em fadiga com mais rapidez porque, quando em atividade, usa ATP mais rapidamente do que pode repor. A proporção individual entre músculo branco e vermelho apresenta um componente genético, e a resistência do músculo de contração rápida pode ser aumentada com treinamento.

O músculo esquelético poder usar ácidos graxos livres, corpos cetônicos ou glicose como combustíveis, dependendo do grau de atividade muscular (**Figura 23-17**). No músculo em repouso, os principais combustíveis são ácidos graxos livres do tecido adiposo e corpos cetônicos do fígado. São oxidados e degradados para produzir acetil-CoA, que entra no ciclo do ácido cítrico para ser oxidada a $CO_2$. A resultante transferência de elétrons para o $O_2$ fornece a energia para a síntese de ATP por fosforilação oxidativa. Os músculos moderadamente ativos usam a glicose sanguínea, além dos ácidos graxos livres e dos corpos cetônicos. A glicose é fosforilada, sendo então degradada pela glicólise a

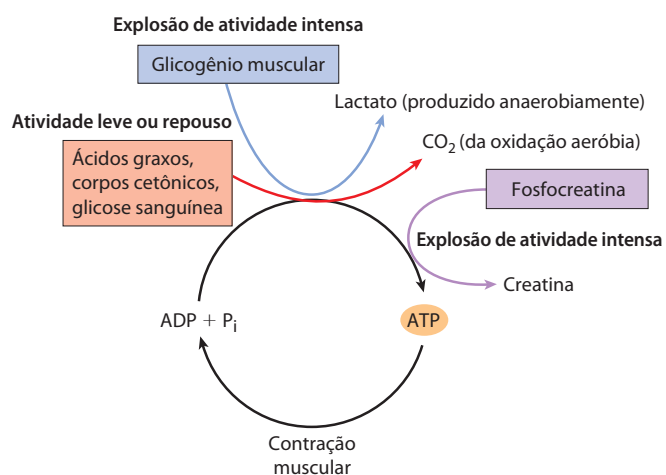



**FIGURA 23-17 Fontes de energia para a contração muscular.** Diferentes combustíveis são usados para a síntese de ATP durante períodos de atividade intensa e durante atividade leve ou repouso. A fosfocreatina fornece ATP rapidamente.

## QUADRO 23-2 Creatina e creatina-cinase: inestimáveis auxiliares do diagnóstico e amigas dos fisiculturistas

Nos tecidos animais com demanda por ATP alta e flutuante, principalmente o músculo esquelético, o músculo cardíaco e o cérebro, existem várias isozimas de creatina-cinase. Uma isozima citoplasmática está presente em regiões de alto uso de ATP (por exemplo, miofibrilas e retículo sarcoplasmático). Pela conversão do ADP produzido durante períodos de alto uso de ATP de volta a ATP, essa isozima previne o acúmulo de ADP em concentrações que poderiam inibir, pela ação das massas, as enzimas que utilizam ATP. Outra isozima da creatina-cinase está localizada em regiões de contato entre as membranas interna e externa da mitocôndria. Essa isozima mitocondrial (CKm) provavelmente serve para enviar equivalentes de ATP produzidos na mitocôndria para os sítios citoplasmáticos de utilização do ATP (Figura Q-1). A substância que se difunde da mitocôndria para as atividades que consomem ATP no citosol é o fosfato de creatina, não o ATP. A isozima CKm colocaliza com o transportador de nucleotídeos de adenina (na membrana mitocondrial interna) e com porina (na membrana mitocondrial externa), o que sugere que esses três componentes possam funcionar juntos no transporte para o citosol do ATP formado na mitocôndria.

Em camundongos nocaute sem a isozima mitocondrial, os miócitos compensam pela produção de mais mitocôndrias, intimamente associadas com as miofibrilas e o retículo sarcoplasmático, o que permite a difusão rápida do ATP mitocondrial para os sítios de utilização. Não obstante, esses camundongos têm capacidade reduzida para correr, indicando um defeito em algum aspecto do metabolismo de suprimento de energia.

A creatina e a fosfocreatina se degradam espontaneamente em creatinina (Figura Q-2). Para manter altos os níveis de creatina, essas perdas devem ser repostas, seja pela creatina da dieta, obtida principalmente da carne (músculo) e produtos lácteos, seja pela síntese *de novo* a partir da glicina, arginina e metionina (Figura 22-28), que ocorre principalmente no fígado e no rim. A síntese *de novo* de creatina é o principal consumidor desses aminoácidos, particularmente nos veganos, para os quais essa é a única fonte de creatina; as plantas não possuem

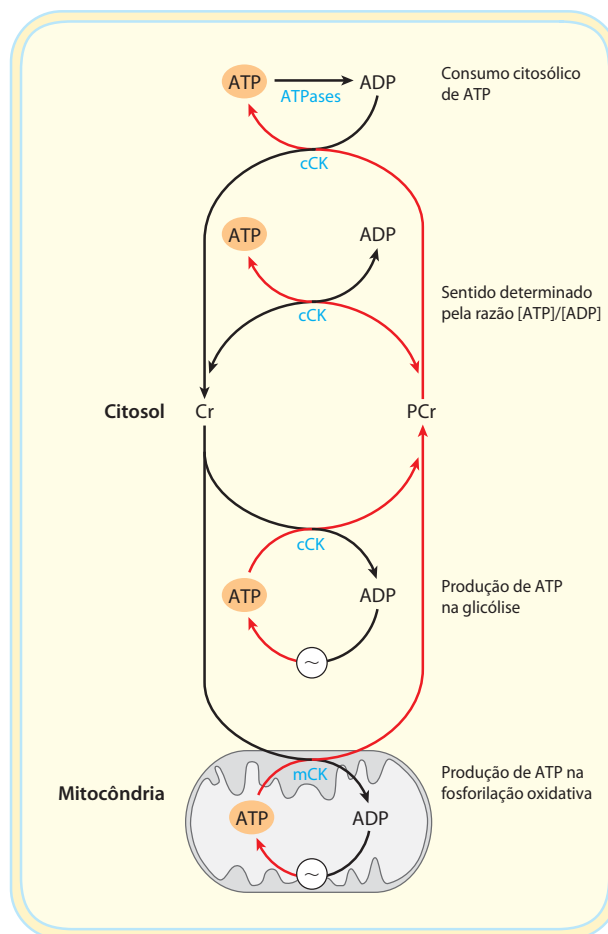



**FIGURA Q-1** A creatina-cinase mitocondrial (CKm) transfere um grupo fosforil do ATP para a creatina (Cr) para formar o fosfato de creatina (PCr), o qual se difunde para os sítios de uso de ATP, nos quais a creatina-cinase citosólica (CKc) transfere o grupo fosforil de volta para o ATP. A CK citosólica também pode utilizar o ATP produzido na glicólise para sintetizar PCr. Durante os períodos de baixa demanda de ATP, os reservatórios de ATP e de PCr são abastecidos em preparação para o próximo período de demanda intensa de ATP. No músculo em repouso, a concentração de PCr é 2 a 3 vezes maior que a de ATP, protegendo a célula contra a depleção rápida do ATP durante curtas explosões de demanda por ATP.

piruvato, o qual é convertido em acetil-CoA e oxidado pelo ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa.

Nos músculos de contração rápida em atividade máxima, a demanda por ATP é tão grande que o fluxo sanguíneo não consegue fornecer $O_2$ e combustíveis com a rapidez necessária para gerar quantidade suficiente de ATP somente pela respiração aeróbia. Nessas condições, o glicogênio armazenado no músculo é degradado em lactato por fermentação (p. 548). Cada unidade de glicose degradada rende três ATP, porque a fosforólise do glicogênio produz glicose-6-fosfato (via glicose-1-fosfato), poupando o ATP normalmente consumido na reação da hexocinase. A fermentação em ácido láctico responde, assim, mais rapidamente do que a fosforilação oxidativa a uma necessidade aumentada de ATP, suplementando sua produção basal de ATP pela oxidação aeróbia de outros combustíveis no ciclo do ácido cítrico e na cadeia respiratória. O uso da glicose sanguínea e do glicogênio do músculo como combustíveis para a atividade muscular é muito incrementado pela secreção de adrenalina, que estimula tanto a liberação de glicose a partir do glicogênio hepático como a degradação de glicogênio no tecido muscular. (A adrenalina controla a resposta de "luta ou fuga", discutida mais extensamente a seguir).

A quantidade relativamente baixa de glicogênio (cerca de 1% do peso total do músculo esquelético) limita a quantidade de energia glicolítica disponível durante o esforço. Além disso, o acúmulo de lactato e a consequente redução do pH nos músculos em atividade máxima reduzem sua e-

ADP ATP
creatina-cinase
PCr
Creatinina
2,6% das reservas de PCr por dia
1,1% das reservas de creatina por dia
$P_i + H_2O$
$H_2O$
Creatina

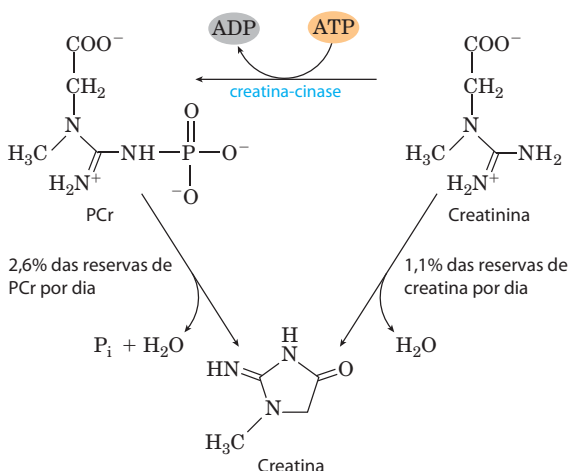



**FIGURA Q-2** A formação espontânea (não enzimática) de creatinina a partir da fosfocreatina ou da creatina consome uma porcentagem baixa do total da creatina por dia, o que deve ser reposto pela biossíntese ou pela dieta.

**FIGURA Q-3** Fisiculturistas consomem com frequência suplementos com creatina para suprir de fosfato de creatina o tecido muscular novo.

creatina. O tecido muscular tem um sistema específico para captar creatina, exportada pelo fígado ou rim, a partir do sangue para as células, contra um considerável gradiente de concentração. A captação eficiente da creatina da dieta requer exercício constante; sem o exercício, a suplementação de creatina é de pouco valor.

O músculo cardíaco tem uma única isozima da creatina-cinase (a isozima MB), normalmente não encontrada no sangue, mas aparece quando liberada pelo músculo lesado por um ataque cardíaco. O nível sanguíneo da BM começa a subir dentro de 2 horas após o ataque, alcança um pico entre 12 e 36 horas e retorna aos níveis normais entre 3 e 5 dias após o ataque. Portanto, a medida da BM no sangue confirma o diagnóstico de um ataque cardíaco e indica aproximadamente quando ele ocorreu.

Os fisiculturistas que estão formando massa muscular têm uma grande necessidade de creatina e comumente consomem suplementos com creatina de até 20 g por dia por poucos dias, seguida de doses de manutenção mais baixas. A combinação do exercício com a suplementação de creatina aumenta a massa muscular (Figura Q-3) e aumenta o desempenho no trabalho de alta intensidade e curta duração. Crianças com erros congênitos nas enzimas de síntese ou de captação da creatina sofrem de incapacidade intelectual grave e ataques. Esses indivíduos têm níveis muito reduzidos de creatina cerebral medidos por NMR (ver Figura 23-18). A suplementação de creatina aumenta as concentrações de creatina e de fosfato de creatina cerebrais e causam um melhora parcial dos sintomas.

No rim saudável, a creatinina proveniente da degradação da creatina é eliminada do sangue para a urina de forma eficiente. Quando a função renal está defeituosa, os níveis de creatinina no sangue aumentam acima da variação normal de 0,8 a 1,4 mg/dL. Creatinina sanguínea elevada está associada com deficiência renal no diabetes e em outras condições nas quais a função renal está temporária ou permanentemente comprometida. A eliminação renal da creatinina varia levemente com a idade, raça e gênero, de forma que a correção do cálculo por esses fatores produz uma medida mais sensível da extensão da função renal, a **taxa de filtração glomerular (GFR)**.

ficiência. O músculo esquelético, contudo, tem outra fonte de ATP, a fosfocreatina (10 a 30 mM), que regenera ATP rapidamente a partir de ADP pela reação da creatina-cinase:

$$\text{Fosfocreatina} + \text{ADP} \underset{\text{durante a recuperação}}{\overset{\text{durante a atividade}}{\rightleftharpoons}} \text{ATP} + \text{Creatina}$$

Fosfocreatina Creatina

Durante períodos de contração ativa e glicólise, esta reação ocorre predominantemente no sentido da síntese de ATP; durante a recuperação do esforço, a mesma enzima sintetiza novamente a fosfocreatina a partir de creatina e ATP. Devido aos níveis relativamente altos de ATP e de fosfocreatina muscular, estes compostos podem ser detectados no músculo isolado, em tempo real, por espectroscopia de RNM (**Figura 23-18**). A creatina serve para enviar equivalentes de ATP da mitocôndria para locais de consumo de ATP e pode ser o fator limitante no desenvolvimento de tecido muscular novo (Quadro 23-2).

Após um período de atividade muscular intensa, a pessoa continua a respirar intensamente por algum tempo, usando muito $O_2$ extra na fosforilação oxidativa no fígado. O

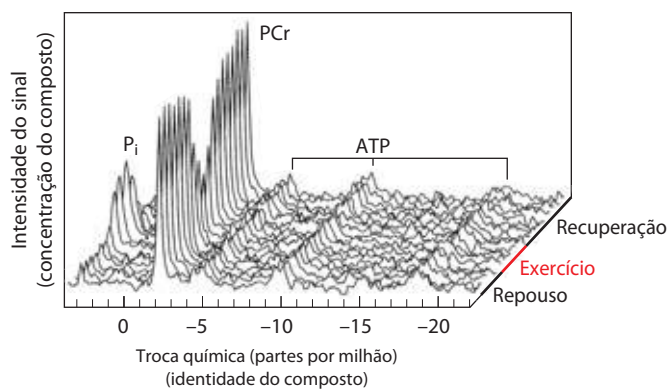



**FIGURA 23-18 A fosfocreatina tampona a concentração de ATP durante o exercício.** Uma representação gráfica de um espectro de ressonância magnética (do $^{31}P$) mostrando o fosfato inorgânico ($P_i$), a fosfocreatina (PCr) e o ATP (cada um dos seus três fosfatos emite um sinal). A série de curvas representa a passagem do tempo, de um período de repouso para um de exercício, e então a recuperação. Observe que o sinal do ATP quase não se altera durante o exercício, mantido alto pela respiração contínua e pelo reservatório de fosfocreatina, que diminui durante o exercício. Durante a recuperação, quando a produção de ATP pelo catabolismo é maior do que a sua utilização pelo músculo (agora em repouso), o reservatório de fosfocreatina é reposto.

ATP produzido é usado para a gliconeogênese (no fígado) a partir do lactato, que foi transportado dos músculos pelo sangue. A glicose assim formada retorna aos músculos para repor seus estoques de glicogênio, completando o ciclo de Cori (**Figura 23-19**; ver também Quadro 15-4).

O músculo esquelético em contração ativa gera calor como um subproduto do acoplamento imperfeito da energia química do ATP com o trabalho mecânico da contração. Essa produção de calor pode ser utilizada quando a temperatura ambiente estiver baixa: o músculo esquelético realiza a **termogênese com calafrio**, contração muscular repetida rapidamente que produz calor, mas pouco movimento, ajudando a manter o corpo na sua temperatura recomendada de 37°C.

**FIGURA 23-19 Cooperação metabólica entre o músculo esquelético e o fígado: o ciclo de Cori.** Músculos extremamente ativos usam o glicogênio como fonte de energia, gerando lactato via glicólise. Durante a recuperação, parte deste lactato é transportada para o fígado e convertida em glicose via gliconeogênese. Esta glicose é liberada no sangue e retorna ao músculo para repor seus estoques de glicogênio. A via total (glicose → lactato → glicose) constitui o ciclo de Cori.

O músculo cardíaco difere do músculo esquelético por ter atividade contínua, em um ritmo regular de contração e relaxamento, e por ter um metabolismo completamente aeróbio o tempo todo. As mitocôndrias são muito mais abundantes no músculo cardíaco do que no esquelético, ocupando quase a metade do volume das células (**Figura 23-20**). O coração usa, como fonte de energia, principalmente ácidos graxos livres, mas também alguma glicose e corpos cetônicos captados do sangue; estes combustíveis são oxidados no ciclo do ácido cítrico e na fosforilação oxidativa para gerar ATP. Como o músculo esquelético, o músculo cardíaco não armazena grandes quantidades de lipídeos ou glicogênio. Ele tem pequenas quantidades de energia de reserva na forma de fosfocreatina, suficiente para poucos segundos de contração. Uma vez que o coração normalmente é aeróbio e obtém a energia a partir da fosforilação oxidativa, o fracasso em levar $O_2$ a determinada região do músculo cardíaco quando os vasos sanguíneos estão bloqueados por depósitos lipídicos (aterosclerose) ou coágulos sanguíneos (trombose coronariana) pode causar a morte do tecido cardíaco nessa região. Isso é o que acontece no infarto do miocárdio, mais comumente conhecido como ataque cardíaco. ■

## O cérebro usa a energia para a transmissão de impulsos elétricos

O metabolismo do cérebro é extraordinário em vários aspectos. Os neurônios do cérebro dos mamíferos adultos

**FIGURA 23-20 Micrografia eletrônica do músculo cardíaco.** Nas mitocôndrias abundantes no tecido cardíaco, o piruvato (procedente da glicose), os ácidos graxos e os corpos cetônicos são oxidados para propiciar a síntese de ATP. Este metabolismo aeróbio permanente permite que o coração humano bombeie sangue a uma taxa de 6 L/min, ou cerca de 350 L/h – ou 200 × $10^6$ L durante 70 anos.

normalmente usam somente glicose como combustível (**Figura 23-21**). (Os astrócitos, outro tipo celular importante no cérebro, podem oxidar ácidos graxos.) O cérebro tem um metabolismo respiratório muito ativo (**Figura 23-22**); ele usa $O_2$ a uma taxa bastante constante, respondendo por quase 20% do total de $O_2$ consumido pelo corpo em repouso. Uma vez que o cérebro tem muito pouco glicogênio, ele depende constantemente da glicose do sangue. A queda significativa da glicose sanguínea abaixo de um nível crítico, mesmo que por um período curto de tempo, pode resultar em mudanças graves, e às vezes irreversíveis, na função cerebral.

Embora os neurônios do cérebro não consigam utilizar ácidos graxos livres ou lipídeos como combustíveis diretamente do sangue, eles podem, quando necessário, usar $\beta$-hidroxibutirato (corpo cetônico) formado no fígado a partir dos ácidos graxos. A capacidade do cérebro de oxidar $\beta$-hidroxibutirato via acetil-CoA torna-se importante durante o jejum prolongado ou a inanição, depois da degradação total do glicogênio hepático, porque permite que o cérebro use a gordura corporal como fonte de energia. Isso poupa proteínas musculares – até que se tornem a fonte final de glicose do cérebro (via gliconeogênese no fígado) durante a inanição grave.

Os neurônios oxidam a glicose pela glicólise e pelo ciclo do ácido cítrico, e o fluxo de elétrons resultante dessas oxidações fornece, pela cadeia respiratória, quase todo o ATP utilizado por essas células. A energia é necessária para criar e manter um potencial elétrico através da membrana plasmática neuronal. A membrana tem um transportador eletrogênico tipo antiporte dependente de ATP, a $Na^+K^+$-ATPase, que bombeia simultaneamente 2 íons $K^+$ para dentro e 3 íons $Na^+$ para fora do neurônio (ver Figura 11-38). O potencial de membrana resultante se altera transitoriamente quando um sinal elétrico (potencial de ação) percorre o neurônio de uma extremidade à outra (ver Figura 12-26). Os potenciais de ação são os mecanismos essenciais de transferência de informação no sistema nervoso, de forma que a depleção de ATP nos neurônios tem efeitos desastrosos sobre todas as atividades coordenadas pela sinalização neuronal.

**FIGURA 23-21 Os combustíveis que suprem o cérebro com ATP.** A fonte de energia usada pelo cérebro varia com o estado nutricional. O corpo cetônico usado durante o jejum é o $\beta$-hidroxibutirato. O transporte eletrogênico pela $Na^+K^+$-ATPase mantém o potencial de membrana essencial para a transferência de informação entre os neurônios.

**FIGURA 23-22 Metabolismo da glicose no cérebro.** A técnica de tomografia de varredura por emissão de pósitrons (PET) mostra a atividade metabólica em regiões específicas do cérebro. Esta técnica permite a visualização, em tempo real, de glicose isotopicamente marcada localizada com precisão em regiões do cérebro de uma pessoa viva. Um análogo de glicose emitindo um pósitron (2-[$^{18}$F]-fluoro-2-desóxi-D-glicose) é injetado na corrente sanguínea; poucos segundos mais tarde, uma varredura PET mostra a quantidade de glicose que é captada em cada região do cérebro – uma medida da atividade metabólica. Na figura são mostradas tomografias de secções transversais do cérebro em três níveis, do topo (à esquerda) para baixo (para a direita). As imagens comparam o metabolismo da glicose na pessoa quando está **(a)** em repouso e **(b)** privada de sono por 48 horas.

## O sangue transporta oxigênio, metabólitos e hormônios

O sangue medeia as interações metabólicas entre todos os tecidos. Ele transporta nutrientes do intestino delgado para o fígado, e do fígado e do tecido adiposo para outros órgãos; também transporta os produtos de excreção dos tecidos extra-hepáticos para o fígado para processamento, e para os rins para eliminação. O oxigênio se desloca na corrente sanguínea dos pulmões para os tecidos, e o $CO_2$ gerado pela respiração tecidual retorna pela corrente sanguínea para os pulmões para ser expelido. O sangue também carrega sinais hormonais de um tecido para outro. No seu papel de transportador de sinais, o sistema circulatório lembra o sistema nervoso; ambos regulam e integram as atividades dos diferentes órgãos.

Um humano adulto médio tem de 5 a 6 L de sangue. Quase a metade desse volume é composta por três tipos de células sanguíneas (**Figura 23-23**): **eritrócitos** (células vermelhas), cheios de hemoglobina e especializados no transporte de $O_2$ e $CO_2$; números muito menores de **leucócitos** (células brancas) de vários tipos (incluindo os **linfócitos**, também encontrados nos tecidos linfáticos), fundamentais para o sistema imune defender o organismo contra

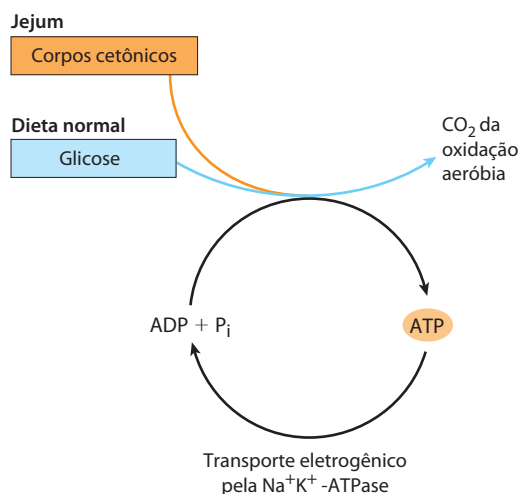
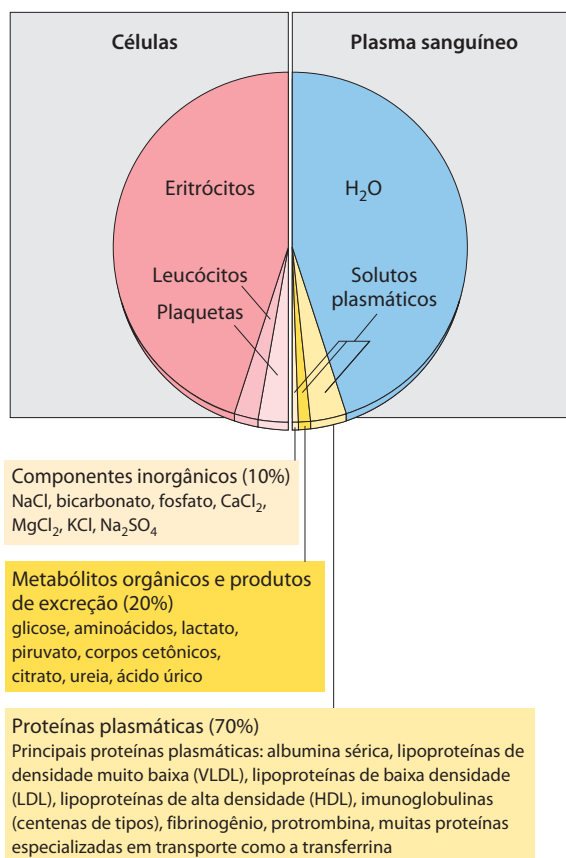



**FIGURA 23-23 A composição do sangue (por peso).** O sangue total pode ser separado por centrifugação em plasma e células. Cerca de 10% do plasma sanguíneo são constituídos por solutos, e destes, cerca de 10% consistem em sais inorgânicos, 20% de moléculas orgânicas pequenas, e 70% de proteínas plasmáticas. Os principais componentes dissolvidos estão listados. O sangue tem muitas outras substâncias, frequentemente em quantidades-traço. Estas incluem outros metabólitos, enzimas, hormônios, vitaminas, elementos-traço e pigmentos biliares. A medida das concentrações dos componentes no plasma sanguíneo é importante no diagnóstico e no tratamento de muitas doenças.

infecções; e **plaquetas**, que ajudam a mediar a coagulação sanguínea. A porção líquida é o **plasma sanguíneo**, com 90% de água e 10% de solutos. Uma vasta gama de proteínas, lipoproteínas, nutrientes, metabólitos, produtos de excreção, íons inorgânicos e hormônios está dissolvida ou em suspensão no plasma. Mais de 70% dos sólidos do plasma são **proteínas plasmáticas**, principalmente imunoglobulinas (anticorpos circulantes), albumina sérica, apolipoproteínas envolvidas no transporte de lipídeos, transferrina (para o transporte de ferro) e proteínas da coagulação sanguínea, como fibrinogênio e protrombina.

Os íons e os solutos de baixa massa molecular do plasma sanguíneo não são componentes fixos, mas estão em fluxo constante entre o sangue e os vários tecidos. O influxo dietético dos íons inorgânicos que são os eletrólitos dominantes do sangue e do citosol ($Na^+$, $K^+$ e $Ca^{2+}$) é, em geral, contrabalançado por sua excreção na urina. Para muitos componentes do sangue, é alcançado algo próximo a um estado de equilíbrio dinâmico: a concentração do componente é pouco alterada, embora ocorra um fluxo contínuo entre o trato digestivo, o sangue e a urina. Os níveis plasmáticos de $Na^+$, $K^+$ e $Ca^{2+}$ permanecem próximos de 140, 5 e 2,5 mM, respectivamente, com pequena variação em resposta ao influxo dietético. Qualquer alteração significativa destes valores resulta em doença séria ou morte. Os rins têm um papel especialmente importante na manutenção do equilíbrio iônico pela filtração seletiva dos produtos de excreção e do excesso de íons do sangue, ao mesmo tempo em que previnem a perda de nutrientes e íons essenciais.

O eritrócito humano perde seu núcleo e mitocôndrias durante a diferenciação. Assim sendo, ele depende apenas da glicólise para a produção de ATP. O lactato produzido pela glicólise retorna ao fígado, onde a gliconeogênese o converte em glicose, que será armazenada como glicogênio ou circulará até os tecidos periféricos. O eritrócito tem constante acesso à glicose sanguínea.

A concentração da glicose no plasma está sujeita a uma estreita regulação. Anteriormente foi abordada a necessidade constante do cérebro por glicose e o papel do fígado na manutenção da glicose sanguínea na faixa normal de 60 a 90 mg/100 mL de sangue total (~4,5 mM). (Uma vez que os eritrócitos compõem uma fração significativa do volume sanguíneo, sua remoção por centrifugação deixa um fluido sobrenadante, o plasma, contendo a "glicose sanguínea" em um volume menor. Para converter a concentração sanguínea da glicose em concentração plasmática, multiplique a concentração sanguínea de glicose por 1,14.) Quando a glicose sanguínea em humanos diminuir para 40 mg/100 mL (condição hipoglicêmica), a pessoa sente desconforto e confusão mental (**Figura 23-24**); reduções adicionais levam ao coma, a convulsões e, em casos de hipoglicemia extrema, à morte. Portanto, a manutenção da concentração normal da glicose no sangue é uma prioridade do organismo e, para alcançá-la, uma grande variedade de mecanismos reguladores evoluiu. Entre os reguladores mais importantes da glicose sanguínea estão os hormônios insulina, glucagon e adrenalina, conforme será discutido na próxima seção. ■

## RESUMO 23.2 Metabolismo específico para cada tecido: a divisão de trabalho

- Nos mamíferos existe uma divisão de trabalho metabólico entre tecidos e órgãos especializados. O fígado é o órgão distribuidor e o principal processador de nutrientes. Os açúcares e os aminoácidos produzidos na digestão atravessam o epitélio intestinal e entram no sangue, que os transporta para o fígado. Alguns triacilgliceróis derivados dos lipídeos ingeridos também fazem seu caminho para o fígado, onde os ácidos graxos constituintes são usados em uma grande variedade de processos.
- A glicose-6-fosfato é o intermediário-chave no metabolismo dos carboidratos. Ela pode ser polimerizada em glicogênio, desfosforilada para fornecer glicose sanguínea ou convertida em ácidos graxos via acetil-CoA. Ela também pode sofrer oxidação na glicólise, no ciclo do ácido cítrico e na cadeia respiratória para gerar ATP, ou entrar na via das pentoses-fosfato, produzindo pentoses e NADPH.

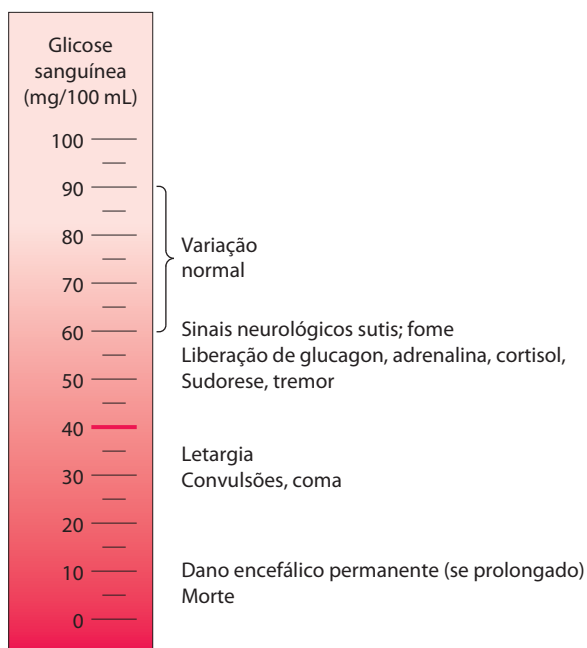



**FIGURA 23-24 Efeitos fisiológicos do baixo nível de glicose sanguínea em humanos.** Os níveis de glicose sanguínea de 40 mg/100 mL ou abaixo constituem hipoglicemia grave.

- Os aminoácidos são utilizados para sintetizar proteínas hepáticas e plasmáticas, ou seus esqueletos carbônicos são convertidos em glicose e glicogênio pela gliconeogênese; a amônia formada pela desaminação é convertida em ureia.
- O fígado converte os ácidos graxos em triacilgliceróis, fosfolipídeos ou colesterol e seus ésteres, que são transportados como lipoproteínas plasmáticas para o armazenamento no tecido adiposo. Os ácidos graxos também podem ser oxidados para gerar ATP ou para formar corpos cetônicos, que se difundem para outros tecidos.
- O tecido adiposo branco armazena grandes reservas de triacilgliceróis, e os libera no sangue em resposta à adrenalina ou ao glucagon. O tecido adiposo marrom é especializado na termogênese, o resultado da oxidação dos ácidos graxos em mitocôndrias desacopladas.
- O músculo esquelético é especializado na produção e no uso do ATP para trabalho mecânico. Durante atividade muscular baixa a moderada, a oxidação dos ácidos graxos e da glicose é a primeira fonte de ATP. Durante a atividade muscular extenuante, o glicogênio é o combustível básico, produzindo ATP pela fermentação láctica. Durante a recuperação, o lactato é reconvertido (pela gliconeogênese) em glicose e glicogênio no fígado para ser usado na reposição dos estoques de glicogênio muscular. A fosfocreatina é uma fonte imediata de ATP durante a contração ativa.
- O músculo cardíaco obtém praticamente todo o seu ATP da fosforilação oxidativa, com os ácidos graxos como o principal combustível.
- Os neurônios do cérebro usam somente glicose e $\beta$-hidroxibutirato como combustíveis, sendo que o último é importante durante o jejum ou a inanição. O cérebro utiliza a maior parte do seu ATP para o transporte ativo de $Na^+$ e $K^+$ para manter o potencial elétrico através da membrana neuronal.
- O sangue transfere nutrientes, produtos de excreção e sinais hormonais entre os tecidos e os órgãos. Isso é realizado por células (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) e pelo líquido rico em eletrólitos (plasma) que contém muitas proteínas.

## 23.3 Regulação hormonal do metabolismo energético

Os ajustes feitos minuto a minuto que mantêm a concentração de glicose sanguínea em cerca de 4,5 mM envolvem as ações combinadas da insulina, do glucagon, da adrenalina e do cortisol sobre os processos metabólicos em muitos tecidos corporais, mas especialmente no fígado, no músculo e no tecido adiposo. A insulina sinaliza para esses tecidos que a glicose sanguínea está mais alta do que o necessário; como resultado, as células captam o excesso de glicose do sangue e o convertem em glicogênio e triacilgliceróis para armazenamento. O glucagon sinaliza que a glicose sanguínea está muito baixa, e os tecidos respondem produzindo glicose pela degradação do glicogênio, pela gliconeogênese (no fígado) e pela oxidação de gorduras para reduzir o uso da glicose. A adrenalina é liberada no sangue para preparar os músculos, os pulmões e o coração para um grande aumento de atividade. O cortisol é responsável por mediar a resposta corporal a estressores de longa duração. Essas regulações hormonais serão discutidas no contexto de três estados metabólicos normais – alimentado, em jejum e em inanição – e serão vistas as consequências metabólicas do diabetes melito, doença que resulta de alterações nas vias de sinalização que controlam o metabolismo da glicose.

### A insulina opõe-se a níveis altos de glicose sanguínea

Agindo por meio de receptores na membrana plasmática (ver Figuras 12-15 e 12-16), a insulina estimula a captação da glicose pelos músculos e pelo tecido adiposo (Tabela 23-3), onde a glicose é convertida em glicose-6-fosfato. No fígado, a insulina também ativa a glicogênio-sintase e inativa a glicogênio-fosforilase, de modo que grande parte da glicose-6-fosfato é canalizada para formar glicogênio.

A insulina também estimula o armazenamento do excesso de combustível no tecido adiposo na forma de gordura (**Figura 23-25**). No fígado, a insulina ativa a oxidação da glicose-6-fosfato em piruvato pela glicólise e a oxidação do piruvato em acetil-CoA. O excesso de acetil-CoA não necessária para a produção de energia é utilizado para a síntese de ácidos graxos, exportados do fígado para o tecido adiposo como TAG de lipoproteínas plasmáticas (VLDL; ver Figura 21-40). A insulina estimula a síntese de TAG nos adipócitos, a partir dos ácidos graxos liberados pelos TAG da VLDL. Esses ácidos graxos são, em última análise, deri-

**TABELA 23-3** Efeitos da insulina sobre a glicose sanguínea: captação de glicose pelas células e armazenamento como triacilgliceróis e glicogênio

| Efeito metabólico | Enzima-alvo |
|---|---|
| ↑ Captação de glicose (músculo, tecido adiposo) | ↑ Transportador de glicose (GLUT4) |
| ↑ Captação de glicose (fígado) | ↑ Glicocinase (expressão aumentada) |
| ↑ Síntese de glicogênio (fígado, músculo) | ↑ Glicogênio-sintase |
| ↓ Degradação de glicogênio (fígado, músculo) | ↓ Glicogênio-fosforilase |
| ↑ Glicólise, produção de acetil-CoA (fígado, músculo) | ↑ PFK-1 (por ↑ PFK-2)<br>↑ Complexo da piruvato-desidrogenase |
| ↑ Síntese de ácidos graxos (fígado) | ↑ Acetil-CoA-carboxilase |
| ↑ Síntese de triacilglicerol (tecido adiposo) | ↑ Lipase lipoproteica |

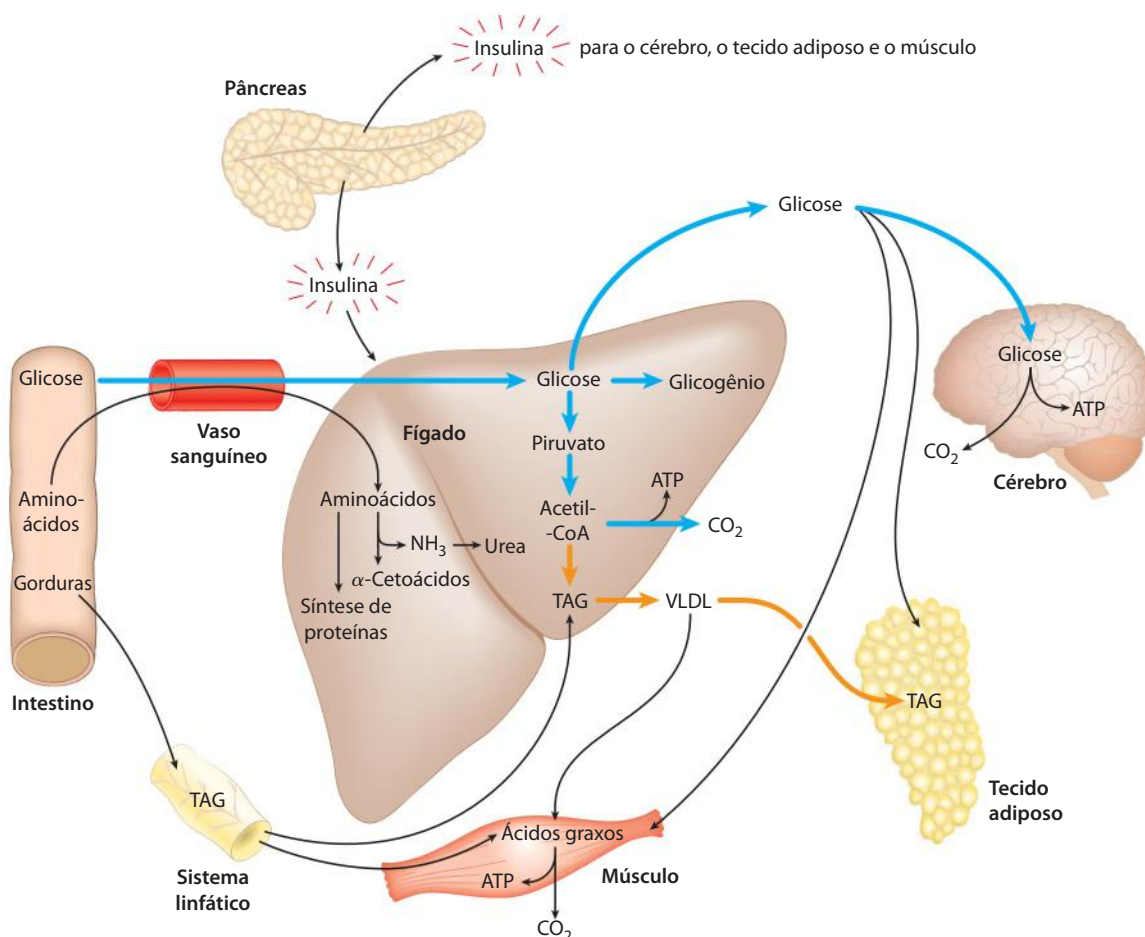



**FIGURA 23-25** **O estado bem-alimentado: o fígado lipogênico.** Imediatamente após uma refeição rica em calorias, a glicose, os ácidos graxos e os aminoácidos entram no fígado. A insulina, liberada em resposta à alta concentração sanguínea de glicose, estimula a captação do açúcar pelos tecidos. Parte da glicose é exportada para o cérebro para suas necessidades energéticas e parte para os tecidos adiposo e muscular. No fígado, o excesso de glicose é oxidado a acetil-CoA, que é usada na síntese de ácidos graxos que são exportados como triacilgliceróis, em VLDL, para os tecidos adiposo e muscular. O NADPH necessário para a síntese de lipídeos é obtido pela oxidação da glicose na via das pentoses-fosfato. O excesso de aminoácidos é convertido em piruvato e acetil-CoA, também usados para a síntese de lipídeos. As gorduras da dieta se deslocam na forma de quilomicra, via sistema linfático, do intestino para o músculo e o tecido adiposo.

vados do excesso de glicose captada do sangue pelo fígado. Em resumo, o efeito da insulina é favorecer a conversão do excesso de glicose sanguínea em duas formas de armazenamento: glicogênio (no fígado e no músculo) e triacilgliceróis (no tecido adiposo).

Além de agir diretamente no músculo e no fígado, mudando seu metabolismo de carboidratos e gorduras, a insulina pode agir no cérebro, sinalizando indiretamente para esses tecidos, conforme descrito mais adiante.

## As células $\beta$ pancreáticas secretam insulina em resposta a alterações na glicose sanguínea

Quando a glicose entra na corrente sanguínea a partir do intestino após uma refeição rica em carboidratos, a quantidade aumentada de glicose no sangue provoca um aumento na secreção de insulina (e uma redução na secreção do glucagon) pelo pâncreas. A liberação de insulina é regulada basicamente pelo nível de glicose no sangue que irriga o pâncreas. Os hormônios peptídicos insulina, glucagon e somatostatina são produzidos por agrupamentos de células pancreáticas especializadas, as ilhotas de Langerhans (**Figura 23-26**). Cada tipo celular das ilhotas produz um único hormônio: as células $\alpha$ produzem glucagon; as células $\beta$, insulina; as células $\delta$, somatostatina.

Conforme mostrado na **Figura 23-27**, quando a glicose sanguínea aumenta, ❶ os transportadores GLUT2 carregam a glicose para dentro das células $\beta$, onde é ime-

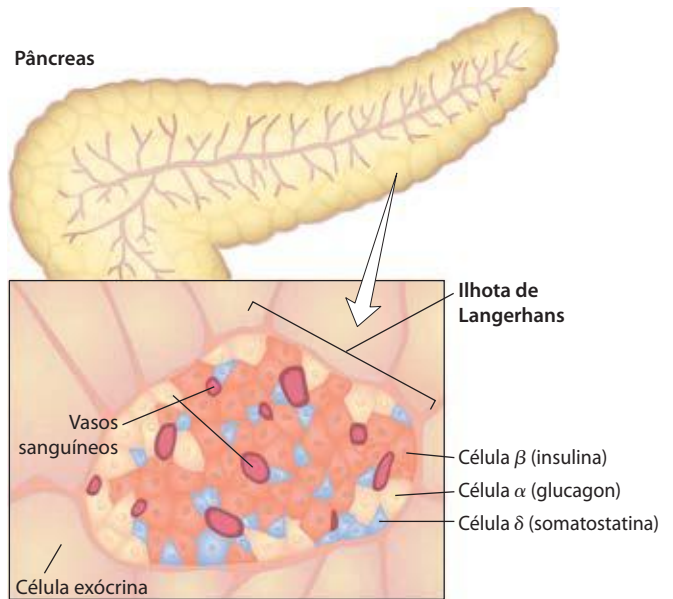



**FIGURA 23-26 O sistema endócrino do pâncreas.** O pâncreas tem células exócrinas (ver Figura 18-3b), que secretam enzimas digestivas na forma de zimogênios, e grupos de células endócrinas, as ilhotas de Langerhans. As ilhotas têm células $\alpha$, $\beta$ e $\delta$ (também conhecidas como células A, B e D, respectivamente), e cada tipo celular secreta um hormônio peptídico específico.

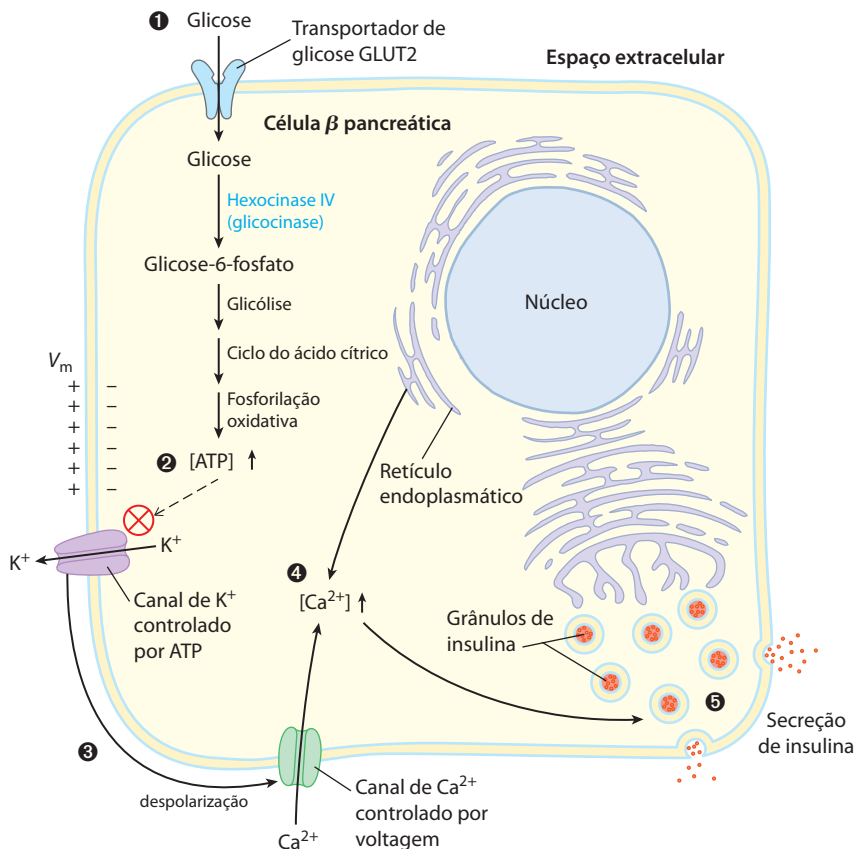



**FIGURA 23-27 Regulação, pela glicose, da secreção de insulina nas células $\beta$ pancreáticas.** Quando o nível sanguíneo de glicose é alto, o metabolismo ativo de glicose nas células $\beta$ aumenta a [ATP] intracelular, fechando os canais de $K^+$ na membrana plasmática e, assim, despolarizando-a. Em resposta a esta despolarização da membrana desencadeada pela alta [ATP], os canais de $Ca^{2+}$ controlados por voltagem se abrem, permitindo o fluxo do íon para dentro da célula. (O $Ca^{2+}$ também é liberado do retículo endoplasmático, em resposta à elevação citosólica inicial da [$Ca^{2+}$].) A concentração citosólica do íon é agora suficientemente alta para provocar a liberação da insulina por exocitose. Os processos numerados são discutidos no texto.

diatamente convertida em glicose-6-fosfato pela hexocinase IV (glicocinase) e entra na glicólise. Com a taxa de catabolismo da glicose mais alta, ❷ a [ATP] aumenta, causando o fechamento dos **canais de $K^+$ controlados por ATP** na membrana plasmática. ❸ O efluxo reduzido de $K^+$ despolariza a membrana. (Lembre, da Seção 12.6, que a saída deste íon por um canal de $K^+$ aberto hiperpolariza a membrana; por essa razão, o fechamento do canal despolariza a membrana.) A despolarização abre canais de $Ca^{2+}$ controlados por voltagem, e ❹ o aumento resultante na $[Ca^{2+}]$ citosólica desencadeia ❺ a liberação da insulina por exocitose. O cérebro integra o suprimento e a demanda de energia, e os sinais dos sistemas nervosos parassimpático e simpático também afetam (estimulam e inibem, respectivamente) a liberação da insulina. Um circuito simples de retroalimentação limita a liberação do hormônio: a insulina reduz a glicose sanguínea estimulando sua captação pelos tecidos; a redução na glicose sanguínea é detectada pelas células $\beta$ pelo fluxo diminuído na reação da hexocinase; isto reduz ou interrompe a liberação da insulina. Essa regulação por retroalimentação mantém a concentração da glicose sanguínea praticamente constante apesar da grande variação na captação dietética.

A atividade dos canais de $K^+$ controlados por ATP é fundamental para a regulação da secreção de insulina pelas células $\beta$. Os canais são octâmeros formados por quatro subunidades Kir6.2 idênticas e quatro subunidades SUR1 idênticas, e são construídos nos mesmos moldes dos canais de $K^+$ das bactérias e das outras células eucarióticas (ver Figuras 11-47 e 11-48). As quatro subunidades Kir6.2 formam um cone ao redor do canal de $K^+$ e funcionam como mecanismo de filtro de seletividade controlado por ATP (**Figura 23-28**). Quando a [ATP] aumenta (indicando aumento da glicose no sangue), os canais de $K^+$ se fecham, despolarizando a membrana plasmática e desencadeando a liberação de insulina, como mostrado na Figura 23-27.

As **sulfonilureias**, medicação oral utilizada no tratamento do diabetes melito tipo 2, se ligam às subunidades SUR1 (receptor de sulfonilureia, de *sulfonylurea receptor*) dos canais de $K^+$, fechando-os e estimulando a liberação de insulina. A primeira geração desses fármacos (tolbutamida, por exemplo) foi desenvolvida na década de 1950. A segunda geração, incluindo gliburida (Micronase), glipizida (Glucotrol) e glimepirida (Amaryl), é mais potente e tem menos efeitos colaterais. (A porção sulfonilureia está destacada em vermelho-claro nas estruturas seguintes.) As sulfonilureias às vezes são usadas em combinação com injeção de insulina, mas muitas vezes conseguem controlar sozinhas o diabetes tipo 2.

Mutações nos canais de $K^+$ controlados por ATP das células $\beta$ felizmente são raras. Mutações em Kir6.2 que causam a *abertura* permanente dos canais (resíduos em vermelho na Figura 23-28b) originam diabetes melito neonatal, com hiperglicemia grave, que requer insulinoterapia. Outras mutações em Kir6.2 ou em SUR1 (resíduos em azul

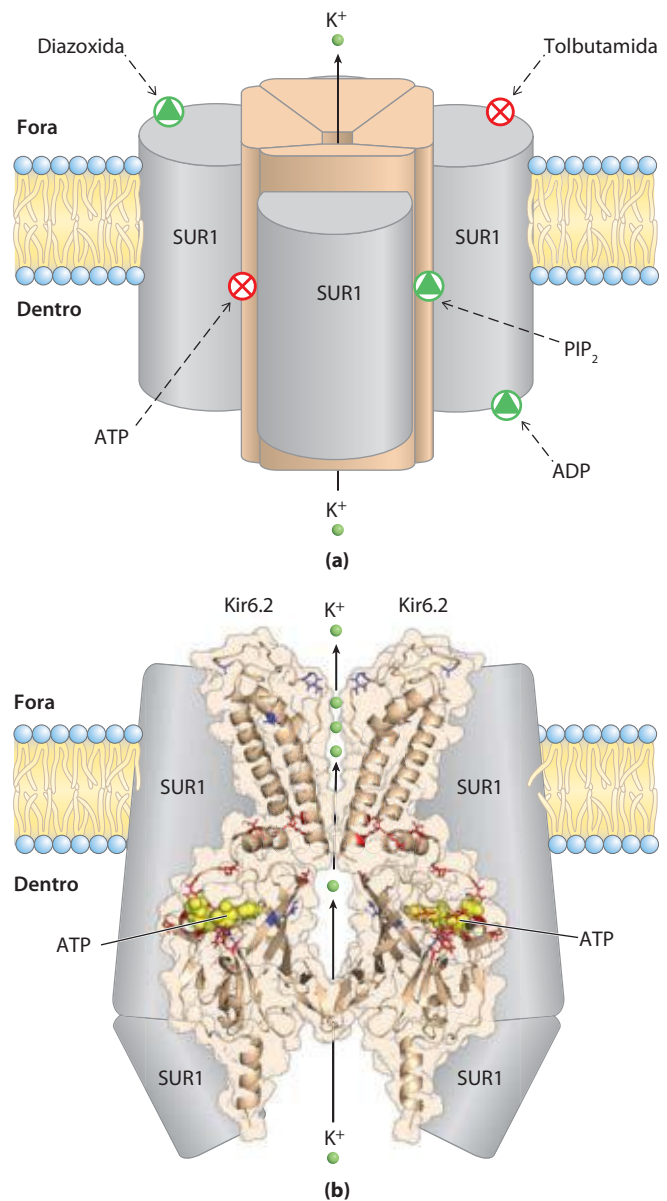
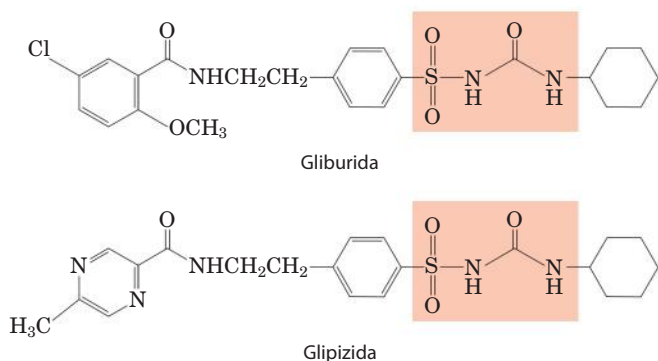



**FIGURA 23-28 Canais de $K^+$ controlados por ATP nas células $\beta$. (a)** O canal, visto no plano da membrana. O canal é formado por quatro subunidades Kir6.2 idênticas, e externamente a elas estão quatro subunidades de SUR1 (receptor de sulfonilureia). As subunidades SUR1 têm sítios de ligação ao ADP e ao fármaco diazoxida, o que favorece a abertura do canal, e à tolbutamida, fármaco de sulfonilureia que favorece o fechamento do canal. As subunidades Kir6.2 constituem o verdadeiro canal e contêm, no lado citosólico, sítios de ligação ao ATP e ao fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), que favorecem, respectivamente, o fechamento e a abertura do canal. **(b)** Estrutura da porção Kir6.2 do canal, vista no plano da membrana. Para tornar mais claro, são mostrados somente dois domínios transmembrana e dois citosólicos. Três íons $K^+$ (em verde) são mostrados na região do filtro de seletividade. Mutações em determinados resíduos de aminoácidos (mostrados em vermelho) causam diabetes neonatal; mutações em outros (mostrados em azul) causam o hiperinsulinismo infantil. Esta estrutura (as coordenadas foram cortesia de Frances Ashford e colaboradores da Universidade de Oxford) não foi obtida por cristalografia, mas pelo mapeamento da sequência conhecida de Kir6.2 sobre a estrutura cristalina de um canal de Kir bacteriano (KirBac1.1; PDB ID 1P7B) e os domínios carboxil e amino de outra proteína Kir, Kir3.1 (PDB ID 1U4E). Compare esta estrutura com a do canal de $K^+$ na Figura 11-48.

Gliburida

Glipizida

na Figura 23-28b) resultam em canais de $K^+$ permanentemente *fechados* e liberação contínua de insulina. Pessoas com essas mutações, se não forem tratadas, desenvolvem hiperinsulinemia congênita (hiperinsulinismo da infância); excesso de insulina causa hipoglicemia grave (baixa glicose sanguínea), levando a danos cerebrais irreversíveis. Um tratamento eficaz é a remoção cirúrgica de parte do pâncreas para reduzir a produção do hormônio. ■

## O glucagon opõe-se a níveis baixos de glicose sanguínea

Várias horas após a ingestão de carboidratos, os níveis de glicose sanguínea diminuem levemente devido à oxidação da glicose pelo cérebro e por outros tecidos. A diminuição da glicose sanguínea desencadeia a secreção do **glucagon** e reduz a liberação da insulina (**Figura 23-29**).

O glucagon causa um *aumento* na concentração sanguínea da glicose de várias maneiras (Tabela 23-4). Como a adrenalina, ele estimula a degradação do glicogênio hepático por ativar a glicogênio-fosforilase e inativar a glicogênio-sintase; ambos os efeitos são o resultado da fosforilação de enzimas reguladas, desencadeada pelo cAMP. O glucagon inibe, no fígado, a degradação da glicose pela glicólise, e estimula sua síntese pela gliconeogênese. Ambos os efeitos resultam da redução da concentração da frutose-2,6-bifosfato, inibidor alostérico da enzima gliconeogênica frutose-1,6-bifosfatase (FBPase-1) e ativador da enzima glicolítica fosfofrutocinase-1. Lembre que a [frutose-2,6-bifosfato] é controlada em última análise por uma reação de fosforilação dependente de cAMP (ver Figura 15-19). O glucagon também inibe a enzima glicolítica piruvato-cinase (promovendo sua fosforilação dependente de cAMP), bloqueando a conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato, e impedindo a oxidação do piruvato no ciclo do ácido cítrico. O consequente acúmulo de fosfoenolpiruvato favorece a gliconeogênese. Esse efeito é aumentado pela estimulação pelo glucagon da síntese da enzima gliconeogênica PEP-carboxicinase. Pela estimulação da degradação do glicogênio, prevenção da glicólise e promoção da gliconeogênese nos hepatócitos, o glucagon permite que o fígado exporte glicose, restaurando seu nível sanguíneo normal.

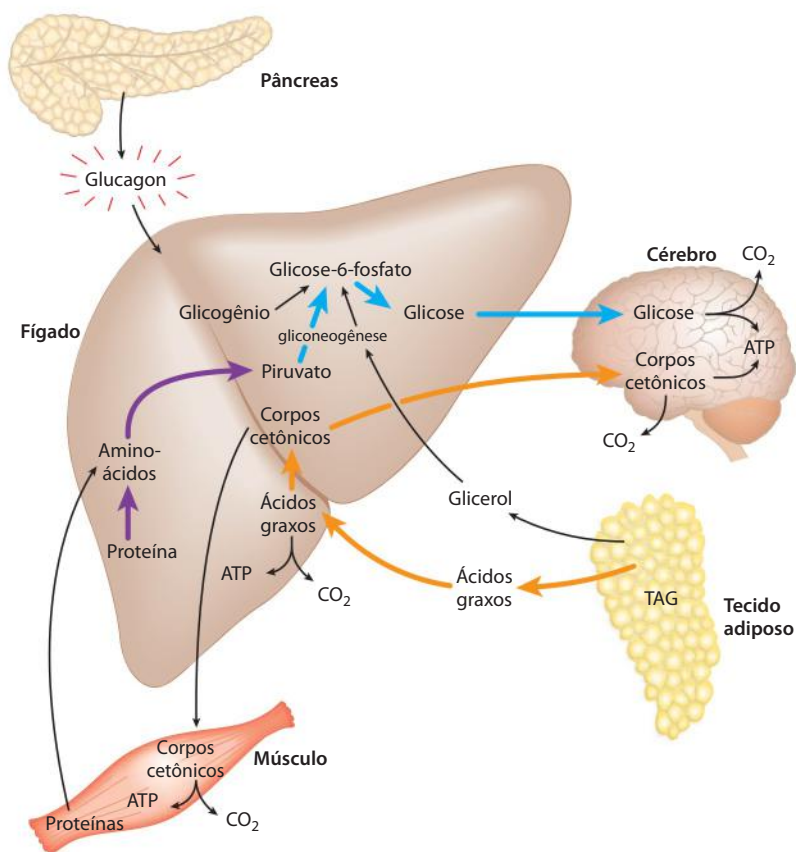



**FIGURA 23-29 O estado de jejum: o fígado glicogênico.** Após algumas horas sem alimento, o fígado torna-se a principal fonte de glicose para o cérebro. O glicogênio hepático é degradado, e a glicose-1-fosfato produzida é convertida em glicose-6-fosfato e, a seguir, em glicose livre, que é liberada para a corrente sanguínea. Os aminoácidos procedentes da degradação das proteínas no fígado e no músculo e o glicerol oriundo da degradação dos TAGs no tecido adiposo são utilizados para a gliconeogênese. O fígado usa os ácidos graxos como seu combustível principal, e o excesso de acetil-CoA é convertido em corpos cetônicos exportados para outros tecidos; o cérebro é particularmente dependente deste combustível quando há deficiência de fornecimento de glicose (ver Figura 23-21). (As setas azuis mostram a trajetória da glicose; as setas alaranjadas, a dos lipídeos; e as setas roxas, a dos aminoácidos.)

**TABELA 23-4** Efeitos do glucagon sobre a glicose sanguínea: produção e liberação de glicose pelo fígado

| Efeito metabólico | Efeito sobre o metabolismo da glicose | Enzima-alvo |
|---|---|---|
| ↑ Degradação de glicogênio (fígado) | Glicogênio ⟶ glicose | ↑ Glicogênio-fosforilase |
| ↓ Síntese de glicogênio (fígado) | Menos glicose armazenada como glicogênio | ↓ Glicogênio-sintase |
| ↓ Glicólise (fígado) | Menos glicose usada como combustível no fígado | ↓ PFK-1 |
| ↑ Gliconeogênese (fígado) | Aminoácidos, Glicerol, Oxaloacetato } ⟶ glicose | ↑ FBPase-2<br>↓ Piruvato-cinase<br>↑ PEP-carboxicinase |
| ↑ Mobilização de ácidos graxos (tecido adiposo) | Menos glicose usada como combustível pelo fígado e pelo músculo | ↑ Lipase sensível a hormônio<br>↑ PKA (perilipina-Ⓟ) |
| ↑ Cetogênese | Fornece alternativa à glicose como fonte de energia para o cérebro | ↓ Acetil-CoA-carboxilase |

Embora seu alvo principal seja o fígado, o glucagon (como a adrenalina) também afeta o tecido adiposo, ativando a degradação de TAG por causar fosforilação, dependente de cAMP, da perilipina e da lipase sensível a hormônio. As lipases ativadas liberam ácidos graxos livres, que são exportados como combustível para o fígado e outros tecidos, poupando glicose para o cérebro. O efeito final do glucagon é, portanto, estimular a síntese e a liberação da glicose pelo fígado e mobilizar os ácidos graxos do tecido adiposo para serem usados no lugar da glicose por outros tecidos que não o cérebro. Todos esses efeitos do glucagon são mediados por fosforilação proteica dependente de cAMP.

## O metabolismo é alterado durante o jejum e a inanição para prover combustível para o cérebro

As reservas de combustível de um adulto humano saudável são de três tipos: glicogênio armazenado no fígado e, em menor quantidade, no músculo; grandes quantidades de triacilgliceróis no tecido adiposo; e proteínas teciduais que podem ser degradadas, quando necessário, para fornecer combustível (Tabela 23-5).

Duas horas após uma refeição, o nível de glicose sanguínea está levemente diminuído, e os tecidos recebem glicose liberada a partir do glicogênio hepático. Há pequena ou nenhuma síntese de triacilgliceróis. Quatro horas após a refeição, a glicose sanguínea está mais reduzida, a secreção de insulina diminuiu e a secreção de glucagon está aumentada. Esses sinais hormonais mobilizam os triacilgliceróis do tecido adiposo, que agora se tornam o principal combustível para o músculo e o fígado. A **Figura 23-30** mostra as respostas ao jejum prolongado. ❶ Para fornecer glicose para o cérebro, o fígado degrada determinadas proteínas – aquelas mais dispensáveis em um organismo que não está se alimentando. Seus aminoácidos não essenciais são transaminados ou desaminados (Capítulo 18), e ❷ os

**TABELA 23-5** Combustível metabólico disponível em um homem com peso normal de 70 kg e em um homem obeso com 140 kg no início do jejum

| Tipo de combustível | Peso (kg) | Equivalente calórico (milhares de kcal [kJ]) | Sobrevivência estimada (meses)* |
|---|---|---|---|
| **Homem com peso normal, 70 kg** | | | |
| Triacilgliceróis (tecido adiposo) | 15 | 140 (590) | |
| Proteínas (principalmente músculo) | 6 | 24 (100) | |
| Glicogênio (músculo, fígado) | 0,23 | 0,90 (3,8) | |
| Combustíveis circulantes (glicose, ácidos graxos, triacilgliceróis, etc.) | 0,023 | 0,10 (0,42) | |
| Total | | 165 (690) | 3 |
| **Homem obeso, 140 kg** | | | |
| Triacilgliceróis (tecido adiposo) | 80 | 750 (3.100) | |
| Proteínas (principalmente músculo) | 8 | 32 (130) | |
| Glicogênio (músculo, fígado) | 0,23 | 0,92 (3,8) | |
| Combustíveis circulantes | 0,025 | 0,11 (0,46) | |
| Total | | 783 (3.200) | 14 |

*O tempo de sobrevivência é calculado assumindo um gasto de energia basal de 1.800 kcal/dia.

grupos amino extras são convertidos em ureia, que é exportada pela corrente sanguínea para os rins e excretada na urina.

Também no fígado, e de certa forma nos rins, os esqueletos de carbono dos aminoácidos glicogênicos são convertidos em piruvato ou intermediários do ciclo do ácido cítrico. ❸ Esses intermediários (assim como o glicerol dos TAG do tecido adiposo) fornecem os materiais de partida para a gliconeogênese no fígado, ❹ gerando glicose para exportar para o cérebro. ❺ Os ácidos graxos liberados do tecido adiposo são oxidados a acetil-CoA no fígado, mas, como o oxaloacetato é depletado pelo uso de intermediários do ciclo do ácido cítrico na gliconeogênese, ❻ a entrada da acetil-CoA no ciclo é inibida e a mesma se acumula. ❼ Isso favorece a formação de acetoacetil-CoA e corpos cetônicos. Após alguns dias de jejum, aumentam os níveis de corpos cetônicos no sangue (**Figura 23-31**), à medida que são exportados do fígado para o coração, o músculo esquelético e o cérebro, que utilizam esses combustíveis em vez da glicose (Figura 23-30, ❽).

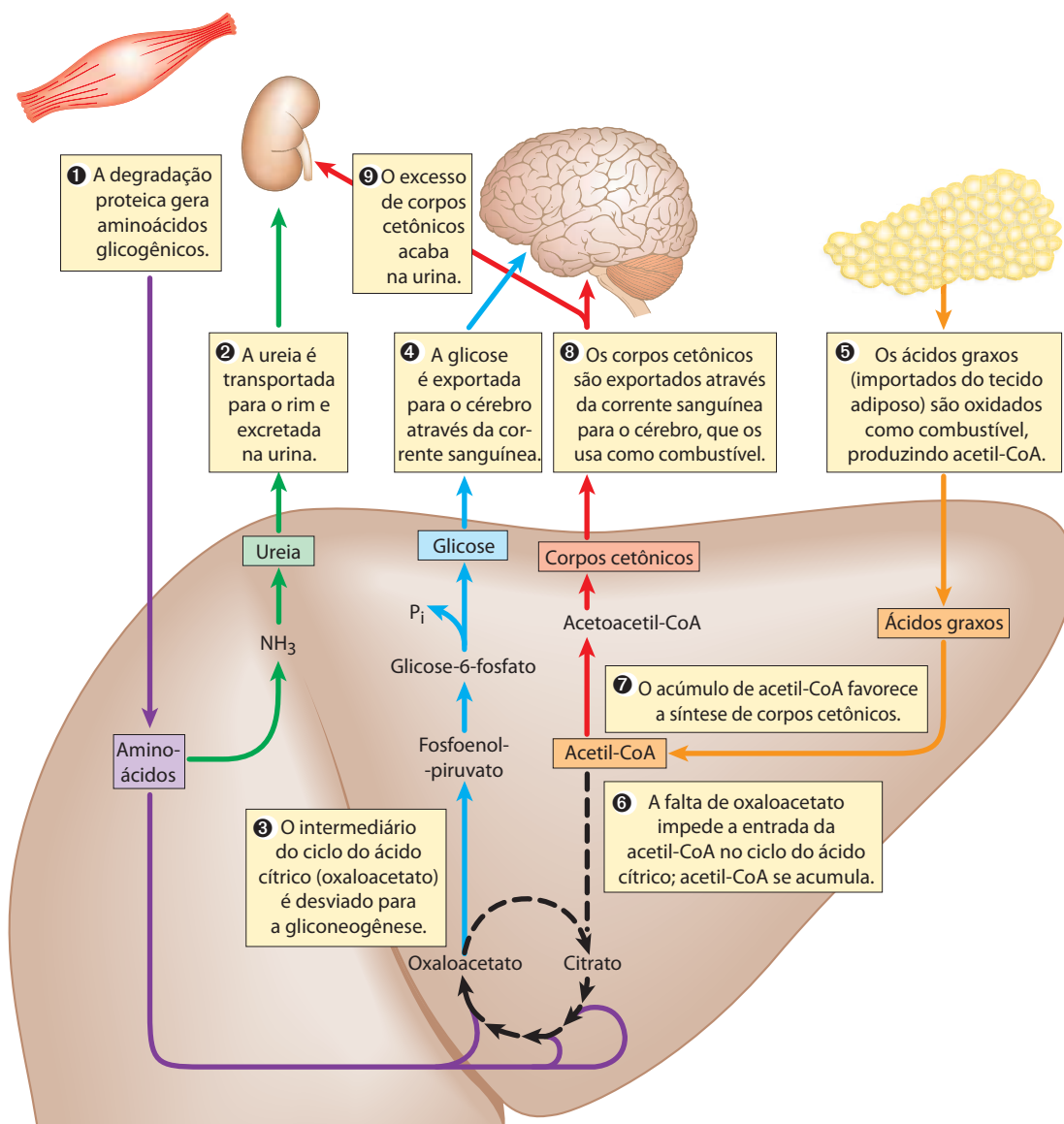



**FIGURA 23-30 Metabolismo energético no fígado durante jejum prolongado ou no diabetes melito não controlado.** As etapas numeradas estão descritas no texto. Após a depleção dos estoques de carboidratos (glicogênio), a gliconeogênese no fígado torna-se a principal fonte de glicose para o cérebro (setas verdes). A $NH_3$ da desaminação dos aminoácidos é convertida em ureia e excretada (setas verdes). Os aminoácidos glicogênicos provenientes da degradação das proteínas (setas roxas) fornecem substratos para a gliconeogênese, e a glicose é exportada para o cérebro. Os ácidos graxos são importados do tecido adiposo para o fígado e são oxidados a acetil-CoA (setas cor de laranja), o material de partida para a formação dos corpos cetônicos no fígado exportados para o cérebro para servirem como a fonte principal de energia (setas vermelhas). Quando a concentração dos corpos cetônicos no sangue excede a capacidade do rim de reabsorver as cetonas, estes compostos começam a aparecer na urina.

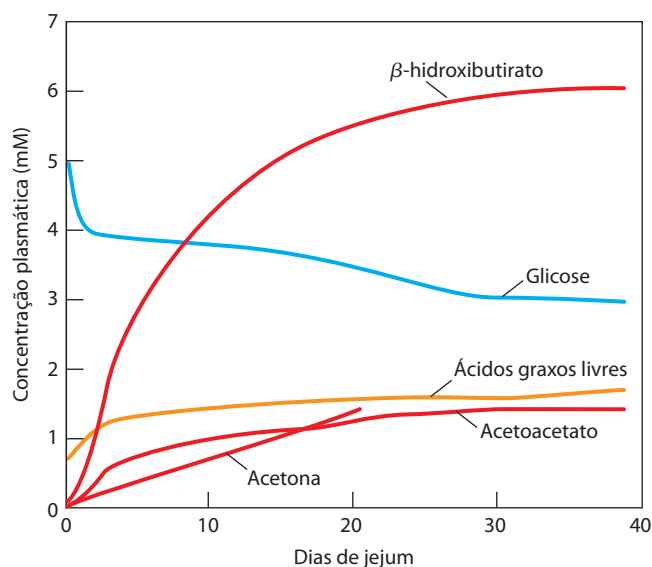



**FIGURA 23-31 Concentração plasmática de ácidos graxos, glicose e corpos cetônicos durante seis semanas de jejum.** Apesar dos mecanismos hormonais para a manutenção do nível de glicose no sangue, ela começa a diminuir depois de dois dias de jejum (em azul). O nível de corpos cetônicos, quase indetectáveis antes do jejum, aumenta drasticamente após 2 a 4 dias de jejum (em vermelho). Estas cetonas hidrossolúveis, acetoacetato e *β*-hidroxibutirato, suplementam a glicose como fonte de energia para o cérebro durante o jejum prolongado. A acetona, o corpo cetônico minoritário, não é metabolizado e é eliminado com a respiração. Um aumento muito menor de ácidos graxos também ocorre no sangue (em cor de laranja), mas esse aumento não contribui para o metabolismo energético no cérebro porque os ácidos graxos não atravessam a barreira hematoencefálica.

A acetil-CoA é crítica na regulação do destino do piruvato; ela inibe alostericamente a piruvato-desidrogenase e estimula a piruvato-carboxilase. Dessa forma, a acetil-CoA previne sua própria produção a partir do piruvato, enquanto estimula a conversão do piruvato em oxaloacetato, a primeira etapa da gliconeogênese.

Os triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo de um adulto com peso normal podem fornecer combustível suficiente para manter uma taxa metabólica basal por cerca de três meses; um adulto muito obeso tem combustível armazenado suficiente para suportar um jejum de mais de um ano (Tabela 23-5). Quando acabam as reservas de gordura, começa a degradação de proteínas *essenciais*; isso leva à perda da função cardíaca e hepática, e, na inanição prolongada, à morte. A gordura armazenada fornece energia suficiente (calorias) durante o jejum ou em uma dieta rígida, mas as vitaminas e os minerais devem ser fornecidos, sendo necessários aminoácidos glicogênicos na dieta em quantidade suficiente para substituir aqueles utilizados na gliconeogênese. As formulações em uma dieta de emagrecimento geralmente são enriquecidas com vitaminas, minerais e aminoácidos ou proteínas.

## A adrenalina sinaliza atividade iminente

Quando um animal é confrontado com uma situação estressante que requer atividade aumentada – lutar ou fugir, em casos extremos – os sinais neuronais originários do cérebro provocam a liberação da adrenalina e da noradrenalina da medula suprarrenal. Ambos os hormônios dilatam as vias aéreas para facilitar a captação de $O_2$, aumentam a frequência e a força dos batimentos cardíacos, e elevam a pressão arterial, favorecendo o fluxo de $O_2$ e de combustíveis para os tecidos (Tabela 23-6). Essa é a resposta de "lutar ou fugir".

A adrenalina age principalmente nos tecidos muscular, adiposo e hepático. Ela ativa a glicogênio-fosforilase e inativa a glicogênio-sintase pela fosforilação, dependente de cAMP, dessas enzimas, estimulando a conversão do glicogênio *hepático* em glicose sanguínea, o combustível para o trabalho muscular anaeróbio. A adrenalina também promove a degradação anaeróbia do glicogênio *muscular* pela fermentação em ácido láctico, estimulando a formação glicolítica de ATP. A estimulação da glicólise é acompanhada pela elevação da concentração de frutose-2,6-bifosfato, um ativador alostérico potente da fosfofrutocinase-1, enzima-chave da glicólise. A adrenalina também estimula a mobilização da gordura no tecido adiposo, ativando (por fosforilação dependente de cAMP) a lipase sensível a hormônio e removendo a perilipina que recobre a superfície das gotículas de gordura (ver Figura 17-3). Finalmente, a adrenalina estimula a secreção de glucagon e inibe a secreção de insulina, reforçando seu efeito de mobilização de combustíveis e inibição de seu armazenamento.

## O cortisol sinaliza estresse, incluindo baixa glicose sanguínea

Uma grande variedade de agentes estressores (ansiedade, medo, dor, hemorragia, infecção, glicose sanguínea baixa, jejum) estimula a liberação do hormônio corticosteroide **cortisol** do córtex suprarrenal. O cortisol age no músculo, no fígado e no tecido adiposo para suprir o organismo com combustível para resistir à situação estressante. O cortisol é um hormônio de ação relativamente lenta, que altera o metabolismo pela mudança nos tipos e nas quantidades de determinadas enzimas sintetizadas em suas células-alvo, em vez da regulação da atividade de moléculas enzimáticas já existentes.

No tecido adiposo, o cortisol provoca um aumento na liberação dos ácidos graxos a partir dos triacilgliceróis armazenados. Os ácidos graxos exportados servem como combustível para outros tecidos, e o glicerol é usado na gliconeogênese no fígado. O cortisol estimula a degradação das proteínas musculares não essenciais e a exportação dos aminoácidos para o fígado, onde servem como precursores para a gliconeogênese. No fígado, o cortisol promove a gliconeogênese por estimular a síntese da enzima-chave PEP-carboxicinase; o glucagon tem o mesmo efeito, enquanto a insulina tem o efeito oposto. A glicose assim produzida é armazenada no fígado como glicogênio ou exportada imediatamente para os tecidos que precisam dela para combustível. O efeito líquido dessas alterações metabólicas é a restauração dos níveis normais de glicose sanguínea e o aumento dos estoques de glicogênio, pronto para dar suporte à resposta de luta ou fuga comumente associada ao estresse. Os efeitos do cortisol, portanto, contrabalançam os da insulina. Durante

**TABELA 23-6** Efeitos fisiológicos e metabólicos da adrenalina: preparação para ação

| Efeitos imediatos | Efeito total |
|---|---|
| **Fisiológicos** | |
| ↑ Frequência cardíaca<br>↑ Pressão sanguínea<br>↑ Dilatação das vias aéreas | Aumento da liberação de $O_2$ para os tecidos (músculo) |
| **Metabólicos** | |
| ↑ Degradação de glicogênio (fígado, músculo)<br>↓ Síntese de glicogênio (fígado, músculo)<br>↑ Gliconeogênese (fígado) | Aumento da produção de glicose para combustível |
| ↑ Glicólise (músculo) | Aumento da produção de ATP no músculo |
| ↑ Mobilização de ácidos graxos (tecido adiposo) | Aumento da disponibilidade de ácidos graxos como combustível |
| ↑ Secreção de glucagon<br>↓ Secreção de insulina | Reforço dos efeitos metabólicos da adrenalina |

períodos prolongados de estresse, a liberação constante de cortisol perde seu valor adaptativo positivo e começa a causar danos ao músculo e ao osso, prejudicando as funções endócrina e imune.

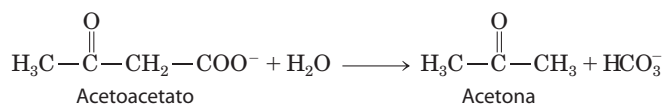
## O diabetes melito resulta de defeitos na produção ou na ação da insulina

O **diabetes melito** é uma doença relativamente comum: quase 6% da população dos Estados Unidos mostram algum grau de anormalidade no metabolismo da glicose, o que é indicativo de diabetes ou de tendência a essa condição. Existem duas classes clínicas principais da doença: **diabetes tipo 1**, às vezes denominado diabetes melito insulina-dependente (DMID), e **diabetes tipo 2,** ou diabetes melito não insulina-dependente (DMNID), também chamado de diabetes resistente à insulina.

O diabetes tipo 1 começa cedo na vida, e os sintomas rapidamente se tornam graves. Essa doença responde à injeção de insulina, porque o defeito metabólico se origina da destruição autoimune das células $\beta$ pancreáticas e de uma consequente incapacidade de produzir insulina em quantidade suficiente. O diabetes tipo 1 requer insulinoterapia e controle cuidadoso, por toda a vida, do equilíbrio entre a ingestão dietética e a dose de insulina. Os sintomas característicos do diabetes tipo 1 (e tipo 2) são sede excessiva e micção frequente (poliúria), levando à ingestão de grandes volumes de água (polidipsia) ("diabetes melito" significa "excreção excessiva de urina doce"). Esses sintomas são devidos à excreção de grande quantidade de glicose na urina, condição conhecida como **glicosúria**.

O diabetes tipo 2 se desenvolve lentamente (em geral em pessoas mais velhas e obesas) e os sintomas são mais brandos e, com frequência, não reconhecidos no início. Este é, na verdade, um grupo de doenças nas quais a atividade reguladora da insulina está perturbada: a insulina é produzida, mas alguns aspectos do sistema de resposta ao hormônio estão defeituosos. As pessoas com essa enfermidade são resistentes à insulina. A conexão entre o diabetes tipo 2 e a obesidade (discutida adiante) é uma área de pesquisa ativa e excitante.

As pessoas com um ou outro tipo de diabetes não conseguem captar de maneira eficiente a glicose do sangue; lembre que a insulina provoca o deslocamento dos transportadores de glicose GLUT4 para a membrana plasmática no músculo e no tecido adiposo (ver Figura 12-16). Sem glicose disponível, os ácidos graxos tornam-se o combustível principal, o que leva a outra alteração metabólica característica no diabetes: a oxidação excessiva, mas incompleta, dos ácidos graxos no fígado. A acetil-CoA produzida pela $\beta$-oxidação não pode ser oxidada completamente pelo ciclo do ácido cítrico, porque a alta relação $[NADH]/[NAD^+]$ produzida pela $\beta$-oxidação inibe o ciclo (lembre que três etapas do ciclo convertem $NAD^+$ em NADH). O acúmulo de acetil-CoA leva à superprodução dos corpos cetônicos, acetoacetato e $\beta$-hidroxibutirato, que não podem ser usados pelos tecidos extra-hepáticos na velocidade com que são produzidos no fígado. Além do $\beta$-hidroxibutirato e do acetoacetato, o sangue das pessoas diabéticas também contém acetona, que resulta da descarboxilação espontânea do acetoacetato:

$$\underset{\text{Acetoacetato}}{H_3C-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-CH_2-COO^-} + H_2O \longrightarrow \underset{\text{Acetona}}{H_3C-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-CH_3} + HCO_3^-$$

A acetona é volátil e é exalada, de modo que, no diabetes não controlado, o hálito tem odor característico, às vezes confundido com etanol. Uma pessoa diabética que apresenta confusão mental devido à alta glicose sanguínea é às vezes diagnosticada incorretamente como intoxicada, erro que pode ser fatal. A superprodução de corpos cetônicos, chamada de **cetose**, resulta em uma concentração muito aumentada desses compostos no sangue (cetonemia) e na urina (cetonúria).

Os corpos cetônicos são ácidos carboxílicos que se ionizam, liberando prótons. No diabetes não controlado, esta produção de ácido pode superar a capacidade do sistema tampão bicarbonato do sangue e produzir uma redução no pH sanguíneo, chamada de **acidose**, ou, em combinação com a cetose, **cetoacidose,** combinação potencialmente letal.

As medidas bioquímicas de amostras de sangue ou de urina são essenciais no diagnóstico e no tratamento do diabetes. O **teste de tolerância à glicose** constitui um critério diagnóstico sensível. A pessoa faz jejum de 12 horas, depois bebe uma dose-teste de 100 g de glicose dissolvida em um copo de água. A concentração sanguínea da glicose é medida antes do teste e por várias horas em intervalos de 30 minutos. Uma pessoa saudável assimila a glicose rapidamente, e o aumento no sangue não é maior do que 9 a 10 mM; muito pouca ou nenhuma glicose aparece na urina. No diabetes, a pessoa assimila muito pouco da dose-teste de glicose; o nível do açúcar no sangue aumenta drasticamente e retorna muito lentamente ao nível do jejum. Uma vez que os níveis sanguíneos de glicose excedem o limiar do rim (cerca de 10 mM), ela aparece também na urina. ■

### RESUMO 23.3 Regulação hormonal do metabolismo energético

- A concentração da glicose no sangue é regulada hormonalmente. As flutuações na glicose sanguínea (normalmente de 60 a 90 mg/100 mL, ou quase 4,5 mM) devidas à ingestão dietética ou ao exercício extenuante são contrabalançadas por uma grande variedade de alterações no metabolismo de vários órgãos, provocadas hormonalmente.
- Alta glicose sanguínea provoca a liberação de insulina, que aumenta a captação de glicose pelos tecidos e favorece o armazenamento de combustíveis sob a forma de glicogênio e triacilgliceróis, enquanto inibe a mobilização dos ácidos graxos no tecido adiposo.
- Baixa glicose sanguínea provoca a liberação do glucagon, que estimula a liberação da glicose a partir do glicogênio hepático e modifica o metabolismo energético no fígado e no músculo no sentido de oxidar ácidos graxos, poupando glicose para ser usada pelo cérebro. No jejum prolongado, os triacilgliceróis tornam-se o combustível principal; o fígado converte ácidos graxos em corpos cetônicos para exportar para outros tecidos, incluindo o cérebro.
- A adrenalina prepara o corpo para um aumento de atividade, mobilizando glicose a partir do glicogênio e de outros precursores e liberando-a no sangue.
- O cortisol, liberado em resposta a uma grande variedade de estressores (incluindo baixa glicose sanguínea), estimula a gliconeogênese a partir de aminoácidos e glicerol no fígado, aumentando a glicose sanguínea e contrabalançando os efeitos da insulina.
- No diabetes, a insulina não é produzida ou não é reconhecida pelos tecidos, e a captação da glicose a partir do sangue é comprometida. Quando os níveis de glicose sanguínea são altos, ela é excretada. Os tecidos dependem então de ácidos graxos como combustível (com produção de corpos cetônicos) e degradam proteínas celulares para fornecer aminoácidos glicogênicos para a síntese de glicose. O diabetes não controlado se caracteriza por altos níveis de glicose no sangue e na urina e produção e excreção de corpos cetônicos.

## 23.4 Obesidade e regulação da massa corporal

Na população dos Estados Unidos, 30% dos adultos são obesos e outros 35% têm sobrepeso, conforme definido em termos de índice de massa corporal (IMC), calculado como (massa em kg)/(altura em m)$^2$. Um IMC abaixo de 25 é considerado normal; uma pessoa com IMC de 25 a 30 tem sobrepeso; IMC maior que 30 indica **obesidade**. A obesidade é uma ameaça à vida. Aumenta significativamente a chance do desenvolvimento de diabetes tipo 2, assim como ataque cardíaco, acidente vascular cerebral e câncer de colo, mama, próstata e endométrio. Em consequência, existe grande interesse em entender como a massa corporal e o armazenamento de gordura no tecido adiposo são regulados. ■

Em uma primeira abordagem, a obesidade é o resultado da ingestão de mais calorias na dieta do que as gastas pelas atividades corporais que consomem combustível. O corpo lida de três formas com o excesso de calorias dietéticas: (1) converte o excesso de combustível em gordura e a armazena no tecido adiposo, (2) queima o excesso de combustível em exercício extra e (3) "desperdiça" combustível, desviando-o para a produção de calor (termogênese) pelas mitocôndrias desacopladas. Nos mamíferos, um conjunto complexo de sinais hormonais e neuronais age para manter o equilíbrio entre a captação do combustível e o gasto de energia, de modo a manter a quantidade de tecido adiposo em nível adequado. Para se lidar efetivamente com a obesidade, é necessário o conhecimento desses diferentes controles e equilíbrios sob condições normais, e de como esses mecanismos homeostáticos podem falhar.

### O tecido adiposo tem funções endócrinas importantes

Uma hipótese inicial para explicar a homeostasia da massa corporal, o modelo da "retroalimentação negativa da adiposidade", postulava um mecanismo que inibe o comportamento alimentar e aumenta o gasto de energia quando o peso corporal excede um determinado valor (o ponto de ajuste); a inibição é liberada quando o peso corporal cai abaixo do ponto de ajuste (**Figura 23-32**). Esse modelo prevê que um sinal de retroalimentação que se origina no tecido adiposo influencia os centros encefálicos que controlam o comportamento alimentar e a atividade (metabólica e motora). O primeiro desses fatores (a leptina) foi descoberto em 1994, e pesquisas subsequentes revelaram que o tecido adiposo é um órgão endócrino importante que produz hormônios peptídicos, conhecidos como **adipocinas**. Podem agir localmente (ação autócrina e parácrina) ou sistemicamente (ação endócrina), levando informações para outros tecidos e para o cérebro sobre a adequação das reservas de energia (TAG) armazenadas no tecido adiposo. As adipocinas normalmente produzem mudanças no metabolismo energético e no comportamento alimentar, as quais restauram as reservas adequadas de combustível e mantêm a massa corporal. Quando as adipocinas são sub ou superproduzidas, o descontrole resultante pode levar a uma doença muito grave.

A **leptina** (do grego, *leptos*, "magro") é uma adipocina (167 aminoácidos) que, ao alcançar o cérebro, age nos receptores hipotalâmicos e reduz o apetite. A leptina foi iden-

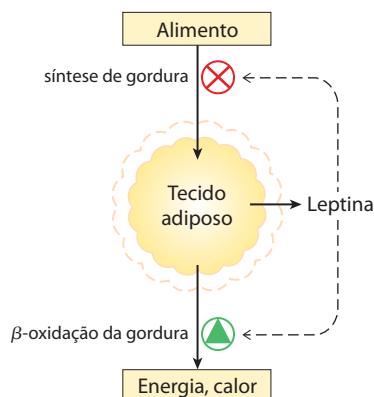



**FIGURA 23-32 Modelo do ponto de ajuste para a manutenção da massa constante.** Quando a massa do tecido adiposo aumenta (linha tracejada), a leptina liberada inibe o consumo de alimentos e a síntese de gordura, estimulando a oxidação dos ácidos graxos. Quando a massa do tecido adiposo diminui (linha contínua), a produção reduzida da leptina favorece uma maior ingestão de alimento e uma redução na oxidação dos ácidos graxos.

tificada pela primeira vez, em camundongos de laboratório, como o produto de um gene designado *OB* (obeso). Os camundongos com duas cópias defeituosas do gene (genótipo *ob/ob*; as letras minúsculas significam a forma mutante do gene) apresentam comportamento e fisiologia de animais em estado de fome constante, com elevados níveis plasmáticos de cortisol; eles não conseguem se manter aquecidos, exibem apetite incontido, têm crescimento anormal e não se reproduzem. Em consequência do apetite incontido, eles se tornam muito obesos, pesando até três vezes mais do que os camundongos normais (**Figura 23-33**). Também apresentam distúrbios metabólicos muito semelhantes aos vistos no diabetes, e são resistentes à insulina. Quando se injeta leptina nestes camundongos *ob/ob*, eles comem menos, perdem peso e aumentam sua atividade locomotora e a termogênese.

**FIGURA 23-33 Obesidade causada pela produção deficiente de leptina.** Ambos os camundongos, que têm a mesma idade, têm defeitos no gene *OB*. O camundongo da direita foi injetado diariamente com leptina purificada e pesa 35 g. O camundongo da esquerda não recebeu leptina, e consequentemente come mais e é menos ativo; ele pesa 67 g.

Um segundo gene de camundongos, designado *DB* (diabético), também tem um papel na regulação do apetite. Camundongos com duas cópias defeituosas (*db/db*) são obesos e diabéticos. O gene *DB* codifica o **receptor de leptina**. A função sinalizadora da leptina é perdida quando o receptor é defeituoso.

O receptor de leptina é expresso principalmente em regiões do cérebro que regulam o comportamento alimentar – neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo (**Figura 23-34a**). A leptina leva a mensagem de que as reservas de

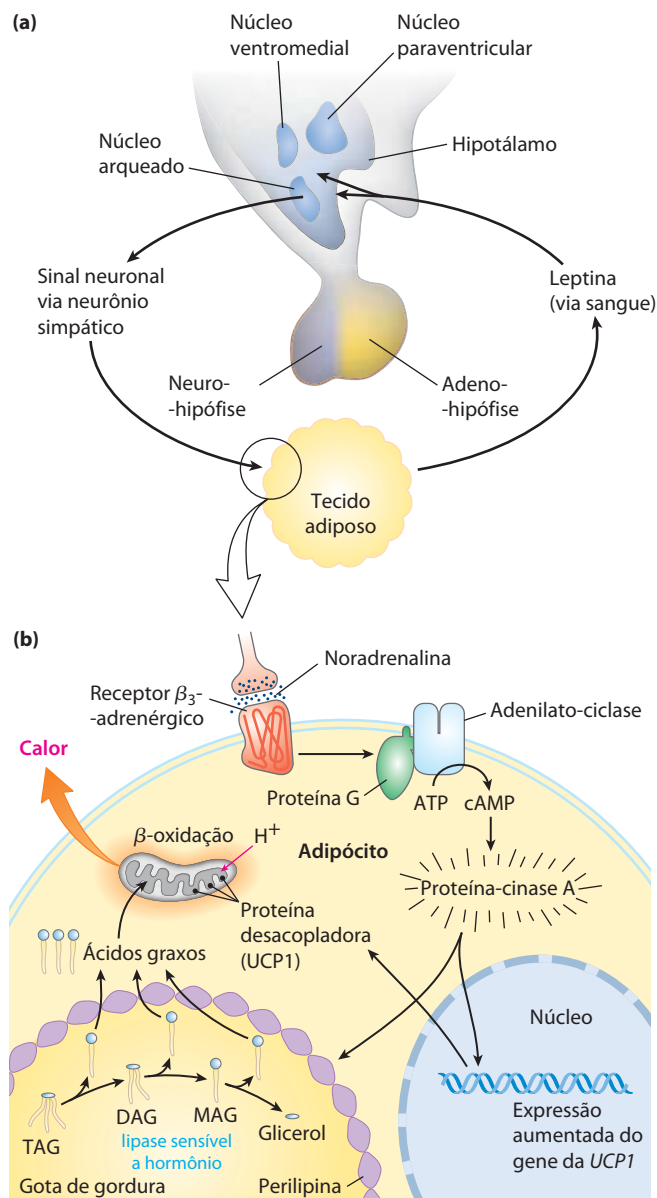
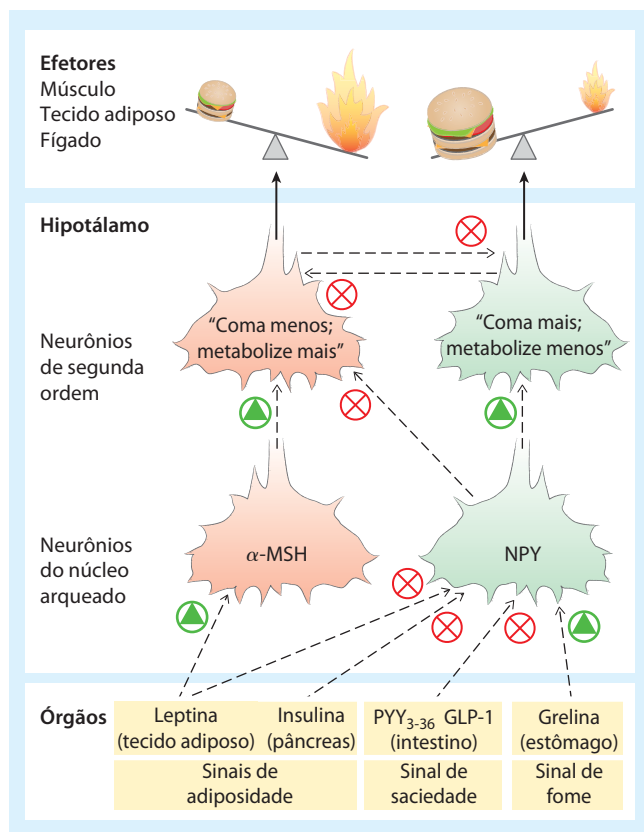



**FIGURA 23-34 Regulação hipotalâmica da ingestão de alimento e do gasto de energia. (a)** Papel do hipotálamo na sua interação com o tecido adiposo. O hipotálamo recebe informação (leptina) do tecido adiposo e responde com sinais neuronais para os adipócitos. **(b)** O efeito da estimulação neuronal inclui a ativação da proteína-cinase A que desencadeia a mobilização dos ácidos graxos dos TAG e sua oxidação desacoplada na mitocôndria, gerando calor, mas não ATP.

gordura são suficientes, e promove uma redução na captação de combustível e um aumento no gasto de energia. A interação leptina-receptor no hipotálamo altera a liberação de sinais neuronais para a região do cérebro que controla o apetite. A leptina também estimula o sistema nervoso simpático, aumentando a pressão sanguínea, a frequência cardíaca e a termogênese, pelo desacoplamento das mitocôndrias dos adipócitos marrons (Figura 23-34b). Lembre que a termogenina, ou UCP, forma um canal na membrana mitocondrial interna, que permite a reentrada de prótons para a matriz mitocondrial sem passar pelo complexo da ATP-sintase. Isso permite a oxidação contínua de combustível (ácidos graxos nos adipócitos marrons) sem síntese de ATP, dissipando a energia na forma de calor e consumindo as calorias da dieta ou as gorduras armazenadas em grandes quantidades.

## A leptina estimula a produção de hormônios peptídicos anorexigênicos

Dois tipos de neurônios do núcleo arqueado controlam o influxo de combustível e seu metabolismo (**Figura 23-35**). Os neurônios **orexigênicos** (estimuladores de apetite) estimulam a ingestão de alimento pela produção e liberação do **neuropeptídeo Y** (**NPY**), que faz o próximo neurônio do circuito enviar o sinal para o cérebro: coma! O nível sanguíneo do NPY aumenta durante o jejum, estando elevado em ambos os camundongos *ob/ob* e *db/db*. É provável que a alta concentração de NPY contribua para a obesidade nesses animais, que comem vorazmente.

Os neurônios **anorexigênicos** (inibidores de apetite) no núcleo arqueado produzem o **hormônio estimulante de melanócito** $\alpha$ ($\alpha$**-MSH**, de $\alpha$-*melanocyte-stimulating hormone*; também conhecido como melanocortina), formado a partir de seu precursor polipeptídico, a pró-opiomelanocortina (POMC; Figura 23-5). A liberação do $\alpha$-MSH faz o neurônio seguinte no circuito enviar o sinal para o cérebro: pare de comer!

A quantidade de leptina liberada pelo tecido adiposo depende do número e do tamanho dos adipócitos. Quando a perda de peso reduz a massa de tecido lipídico, os níveis de leptina no sangue diminuem, a produção de NPY aumenta e o processo no tecido adiposo, mostrado na Figura 23-34, é revertido. O desacoplamento diminui, reduzindo a termogênese e poupando combustível, e a mobilização de gordura é reduzida em resposta à redução da sinalização pelo cAMP. O consumo de maior quantidade de alimento, combinado com a utilização mais eficiente do combustível, resulta na recuperação das reservas no tecido adiposo, levando o sistema de volta ao equilíbrio.

A leptina também pode ser essencial ao desenvolvimento normal dos circuitos neuronais hipotalâmicos. Em camundongos, o crescimento das fibras nervosas a partir do núcleo arqueado durante o desenvolvimento cerebral inicial é diminuído na ausência de leptina, afetando os sinais orexigênicos e (em menor grau) os sinais anorexigênicos do hipotálamo. É possível que os níveis de leptina *durante o desenvolvimento* desses circuitos determinem os detalhes das conexões deste sistema de regulação.

**FIGURA 23-35 Hormônios que controlam a ingestão de alimento.** No núcleo arqueado, dois grupos de células neurossecretoras recebem um sinal hormonal e liberam sinais neuronais para as células do músculo, do tecido adiposo e do fígado. A leptina e a insulina são liberadas do tecido adiposo e do pâncreas, respectivamente, em proporção com a massa da gordura corporal. Os dois hormônios agem sobre as células neurossecretoras anorexigênicas e provocam a liberação de $\alpha$-MSH (hormônio estimulador de melanócitos); este hormônio envia o sinal a neurônios de segunda ordem no hipotálamo, os quais produzem sinais neuronais para comer menos e metabolizar mais combustível. A leptina e a insulina também agem sobre as células neurossecretoras orexigênicas e inibem a liberação de NPY, reduzindo o sinal de "comer mais" enviado para os tecidos. Conforme descrito mais adiante no texto, o hormônio gástrico grelina *estimula* o apetite por ativar as células que expressam NPY; o $PYY_{3-36}$, liberado pelo colo, *inibe* estes neurônios, reduzindo assim o apetite. Cada um dos tipos de células neurossecretoras inibe a produção de hormônios pelo outro tipo, de forma que qualquer estímulo que ative as células orexigênicas inativa as células anorexigênicas, e vice-versa. Isto fortalece o efeito dos sinais de estimulação.

## A leptina dispara uma cascata de sinalização que regula a expressão gênica

O sinal da leptina é transduzido por um mecanismo usado também pelos receptores de interferon e fatores de crescimento, o sistema JAK-STAT (**Figura 23-36**; ver Figura 12-18). O receptor de leptina, que tem um único segmento transmembrana, dimeriza quando a leptina se liga ao domínio extracelular de dois monômeros. Ambos os monômeros são fosforilados pela **Janus-cinase** (**JAK**),

**FIGURA 23-36 O mecanismo JAK-STAT da transdução de sinal da leptina no hipotálamo.** A ligação da leptina induz a dimerização do seu receptor, seguida pela fosforilação de resíduos específicos de Tyr no domínio citosólico do receptor, catalisada pela Janus-cinase (JAK). As STAT ligadas ao receptor de leptina fosforilado são agora fosforiladas em resíduos de Tyr por uma atividade distinta da JAK. As STAT dimerizam, ligando seus resíduos de Ⓟ-Tyr fosforilados, e entram no núcleo. Lá se ligam a regiões reguladoras específicas no DNA e alteram a expressão de determinados genes. Os produtos destes genes influenciam o comportamento alimentar e o gasto de energia do organismo.

em um resíduo de Tyr de seu domínio intracelular. Os resíduos de Ⓟ-Tyr tornam-se locais de ancoragem para três proteínas que são transdutores de sinal e ativadores de transcrição (**STAT** 3, 5 e 6; às vezes chamadas de *fat*-STAT). As STAT ancoradas são então fosforiladas em resíduos de Tyr pela mesma JAK. Após a fosforilação, as STAT dimerizam e são translocadas para o núcleo, onde se ligam a sequências específicas no DNA e estimulam a transcrição de genes-alvo, incluindo o gene da POMC, a partir do qual é produzido o $\alpha$-MSH.

O aumento do catabolismo e da termogênese provocado pela leptina é devido em parte ao aumento da síntese da proteína desacopladora mitocondrial termogenina (produto do gene *UCP1*) nos adipócitos marrons. A leptina altera as transmissões sinápticas dos neurônios no núcleo arqueado para o tecido adiposo e outros tecidos, estimulando a síntese de termogenina pelo sistema nervoso simpático. A liberação aumentada de noradrenalina resultante nesses tecidos age por meio dos receptores $\beta_3$-adrenérgicos, estimulando a transcrição do gene *UCP1.* O resultante desacoplamento da transferência de elétrons da fosforilação oxidativa consome gordura e é termogênico (Figura 23-34).

A obesidade humana seria o resultado de produção insuficiente de leptina, sendo assim tratável por injeções desse hormônio? Os níveis sanguíneos de leptina estão, na verdade, muito *mais altos* em animais obesos (incluindo os humanos) do que em animais com massa corporal normal (exceto, é claro, nos mutantes *ob/ob,* que não produzem leptina). Alguns elementos a jusante no sistema de resposta à leptina devem estar defeituosos nas pessoas obesas, e a elevação de leptina é o resultado de uma tentativa (malsucedida) de superar a resistência à leptina. Nos casos muito raros de humanos com obesidade extrema que têm um gene de leptina defeituoso (*OB*), as injeções de leptina resultam, de fato, em enorme perda de peso. Contudo, na imensa maioria das pessoas obesas, o gene *OB* está intacto. Em testes clínicos, a injeção de leptina não tem o efeito de redução de peso observado nos camundongos obesos *ob/ob*. A maioria dos casos de obesidade humana envolve, claramente, um ou mais fatores além da leptina.

## O sistema da leptina pode ter evoluído para regular a resposta à fome

O sistema da leptina provavelmente evoluiu para ajustar a atividade e o metabolismo animal durante períodos de jejum e inanição, e não como um meio de restringir o ganho de peso. A *redução* no nível de leptina, provocada pela deficiência nutricional, reverte os processos de termogênese ilustrados na Figura 23-34, permitindo a conservação de combustível. No hipotálamo, a redução do sinal da leptina também provoca redução na produção do hormônio da tireoide (reduzindo o metabolismo basal), redução na produção de hormônios sexuais (prevenindo a reprodução) e aumento na produção de glicocorticoides (mobilizando os recursos corporais geradores de combustível). Por minimização do gasto de energia e maximização do uso das reservas endógenas de energia, essas respostas mediadas pela leptina podem permitir a um animal sobreviver em períodos de grave privação nutricional. No fígado e no músculo, a leptina estimula a **proteína-cinase ativada por AMP** (**AMPK**), a qual inibe a síntese de ácidos graxos e ativa sua oxidação, favorecendo os processos geradores de energia.

## A insulina age no núcleo arqueado, regulando a ingestão de alimento e a conservação de energia

A secreção de insulina pode refletir o tamanho das reservas de gordura (adiposidade) e o equilíbrio do fluxo de energia (nível de glicose no sangue). Além de sua função endócrina em vários tecidos, a insulina age no sistema nervoso central (no hipotálamo) para inibir a ingestão de alimento (Figura 23-35). Os receptores de insulina dos neurônios orexigênicos do núcleo arqueado *inibem* a liberação de NPY, e os receptores de insulina dos neurônios anorexigênicos *estimulam* a produção de $\alpha$-MSH, reduzindo, dessa forma, o influxo de combustível e aumentando a termogênese. A insulina também envia sinais ao músculo, ao fígado e ao tecido adiposo, pelos mecanismos descritos na Seção 23.3, para aumentarem a conversão de glicose em acetil-CoA, fornecendo o material de partida para a síntese de gordura.

As ações da leptina e da insulina não são totalmente independentes. A leptina torna as células do fígado e do músculo mais sensíveis à insulina. Uma hipótese para explicar esse efeito sugere interação entre as tirosina-cinases

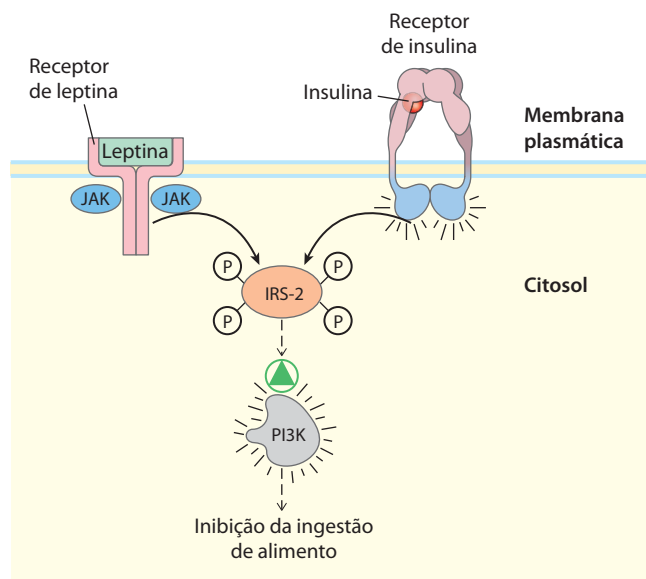



**FIGURA 23-37 Provável mecanismo para a intercomunicação entre os receptores de insulina e de leptina.** O receptor de insulina tem atividade intrínseca de tirosina-cinase (ver Figura 12-15), e o receptor de leptina, quando ocupado pelo seu ligante, é fosforilado por uma tirosina-cinase solúvel (JAK). Uma possível explicação para a interação observada entre a insulina e a leptina é que ambas podem fosforilar o mesmo substrato – no caso mostrado aqui, o substrato-2 do receptor de insulina (IRS-2). Quando fosforilado, o IRS-2 ativa a PI3K, o que tem consequências a jusante, incluindo a inibição da ingestão de alimento. O IRS-2 serve aqui como integrador do sinal dos dois receptores.

ativadas pela leptina e aquelas ativadas pela insulina (**Figura 23-37**); segundos mensageiros comuns às duas vias de sinalização permitem que a leptina desencadeie alguns dos mesmos eventos a jusante desencadeados pela insulina, por meio do substrato 2 do receptor de insulina (IRS-2, de *insulin receptor substrate-2*) e da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) (ver Figura 12-16).

## A adiponectina age por meio da AMPK, aumentando a sensibilidade à insulina

A **adiponectina**, hormônio peptídico (224 aminoácidos) produzido quase exclusivamente no tecido adiposo, é uma adipocina que sensibiliza outros órgãos para os efeitos da insulina, protege contra a aterosclerose e inibe respostas inflamatórias (adesão de monócitos, transformação de macrófagos e proliferação e migração das células da musculatura lisa vascular). A adiponectina circula no sangue e tem efeito potente sobre o metabolismo dos ácidos graxos e dos carboidratos no fígado e no músculo. Ela aumenta a captação de ácidos graxos pelos miócitos, a partir do sangue, e a taxa da $\beta$-oxidação no músculo. Também bloqueia a síntese de ácidos graxos e a gliconeogênese nos hepatócitos, e estimula a captação de glicose e seu catabolismo no fígado e no músculo.

Esses efeitos da adiponectina são indiretos e não totalmente compreendidos, mas a AMPK claramente controla muitos deles. A adiponectina, por meio de seu receptor na membrana plasmática, causa a fosforilação e a ativação da AMPK. Lembre-se de que a AMPK é ativada por fatores que sinalizam a necessidade de substituir o metabolismo de biossíntese pelo de geração de energia (**Figura 23-38**). Quando ativada, a AMPK fosforila proteínas-alvo críticas para o metabolismo de lipídeos e carboidratos, com profundos efeitos no metabolismo de todo o animal (**Figura 23-39**). Os receptores de adiponectina estão presentes também no cérebro; o hormônio ativa a AMPK no hipotálamo, estimulando a captação de alimento e reduzindo o gasto de energia.

A acetil-CoA-carboxilase é uma enzima ativada pela AMPK no fígado e no tecido adiposo branco. Essa enzima produz malonil-CoA, o primeiro intermediário comprometido com a síntese de ácidos graxos. A malonil-CoA é um potente inibidor da enzima carnitina-aciltransferase I, que inicia o processo de $\beta$-oxidação pelo transporte dos ácidos graxos para a mitocôndria (ver Figura 17-6). A AMPK inibe a síntese de ácidos graxos pela fosforilação e inativação da acetil-CoA-carboxilase, ao mesmo tempo em que alivia a inibição (pela malonil-CoA) da $\beta$-oxidação (ver Figura 17-13). A síntese de colesterol também é inibida pela AMPK, que fosforila e inativa a HMG-CoA-redutase, enzima da via do colesterol (ver Figura 21-34). Da mesma forma, AMPK inibe a ácido graxo-sintase e a aciltransferase, bloqueando efetivamente a síntese de triacilgliceróis. Em resumo, a síntese dos lipídeos é inibida e seu uso como combustível é estimulado.

Camundongos com o gene da adiponectina defeituoso são menos sensíveis à insulina do que aqueles com adiponectina normal, e mostram baixa tolerância à glicose: a ingestão de carboidratos causa um aumento duradouro na glicose sanguínea. Esses defeitos metabólicos são semelhantes aos dos humanos com diabetes tipo 2, os quais também são **insensíveis à insulina** e removem muito lentamente a glicose do sangue. De fato, pessoas com obesidade ou diabetes tipo 2 têm níveis sanguíneos de adiponectina mais baixos do que os controles não diabéticos. Além disso, os fármacos usados no tratamento do diabetes tipo 2 – as tiazolidinedionas, como a rosiglitazona (Avandia) e a pioglitazona (Actos) (p. 852) – aumentam a expressão do mRNA da adiponectina no tecido adiposo e aumentam os níveis sanguíneos desse

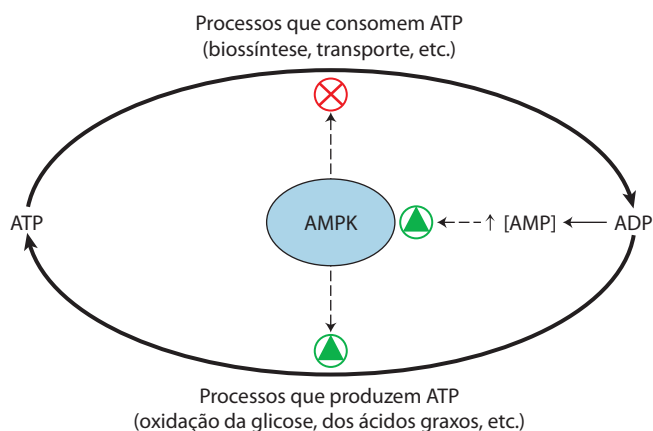



**FIGURA 23-38 O papel da proteína-cinase ativada por AMP (AMPK) na regulação do metabolismo do ATP.** O ADP produzido em reações biossintéticas é convertido em AMP pela adenilato-cinase. O AMP ativa a AMPK, que regula vias de geração e de consumo de ATP pela fosforilação de enzimas-chave (ver Figura 23-39).

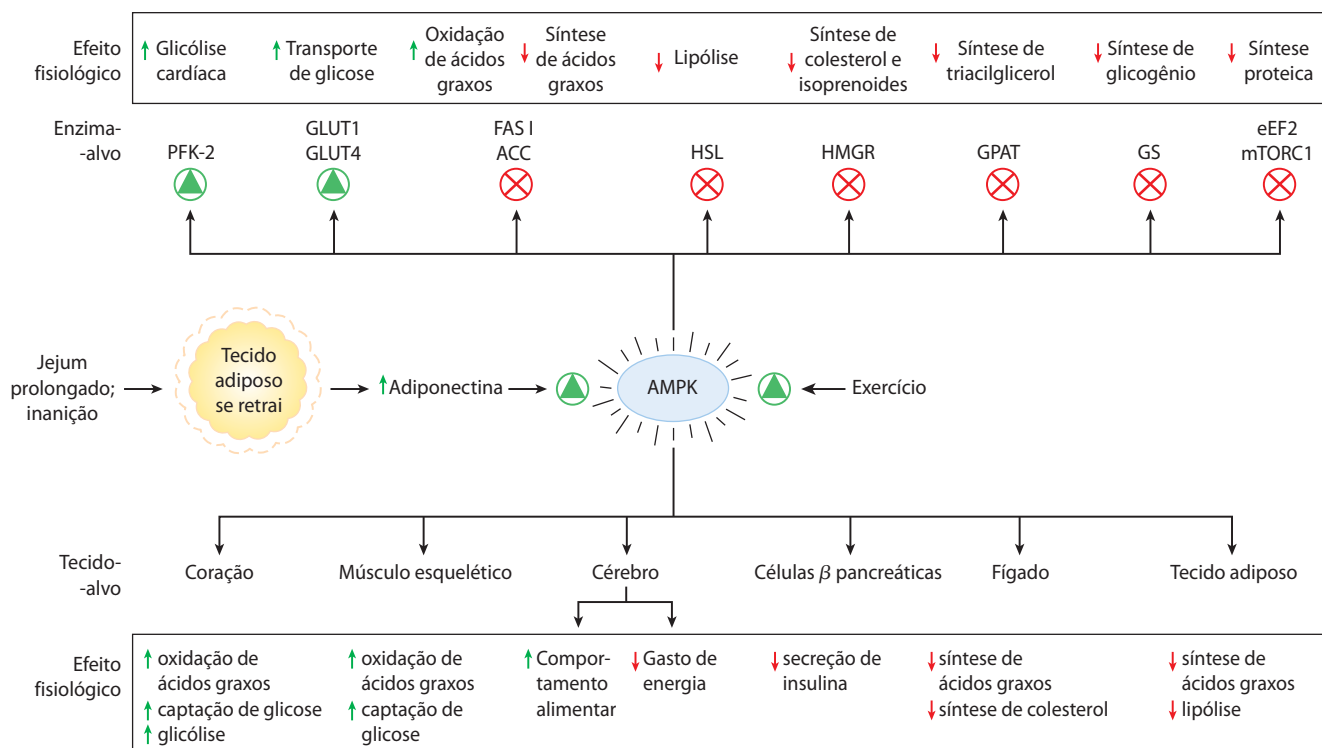



**FIGURA 23-39 Formação de adiponectina e suas ações por meio da AMPK.** O jejum prolongado ou a inanição resultam na redução das reservas de triacilgliceróis no tecido adiposo, o que desencadeia a produção de adiponectina e sua liberação dos adipócitos. A elevação da adiponectina plasmática age por meio de seus receptores de membrana plasmática em vários órgãos e tipos celulares, inibindo processos que consomem energia e estimulando processos geradores de energia. A adiponectina age no cérebro, por meio de seus receptores, estimulando a ingestão de alimentos e inibindo a atividade física que consome energia e a termogênese na gordura marrom. Este hormônio exerce seus efeitos metabólicos por ativar a AMPK, que regula (por fosforilação) enzimas específicas em processos metabólicos essenciais (ver Figura 15-8). PFK-2, fosfofrutocinase-2; GLUT1 e GLUT4, transportadores de glicose; FAS 1, ácido graxo-sintase 1; ACC, acetil-CoA-carboxilase; HSL, lipase sensível a hormônio; HMGR, HMG-CoA-redutase; GPAT, aciltransferase; GS, glicogênio-sintase; eEF2, fator 2 de alongamento de eucariotos (necessário para a síntese proteica; ver Capítulo 27); mTOR1, alvo de rapamicina de mamíferos (proteína-cinase que regula a síntese proteica com base na disponibilidade de nutrientes; ver Figura 23-40). Fármacos como as tiazolidinedionas ativam o fator de transcrição PPARγ (ver Figuras 23-41 e 23-42), o qual promove a síntese da adiponectina, ativando indiretamente a AMPK. O exercício também estimula a AMPK, por meio da conversão de ATP em ADP e AMP.

hormônio em animais de experimentação; eles também ativam a AMPK (Figura 23-39). (Em 2011, a FDA concluiu que o uso da Avandia foi associado com um aumento do risco de ataque cardíaco, e por isso limitou o uso do fármaco àqueles pacientes diabéticos para os quais outros tratamentos disponíveis não eram efetivos). A adiponectina parece ser uma ligação importante entre o diabetes tipo 2 e seu mais importante fator de predisposição, a obesidade. ■

## A atividade de mTORC1 coordena o crescimento celular com o fornecimento de nutrientes e energia

A atividade de uma segunda proteína-cinase nova auxilia na mediação da proliferação celular e no aumento do tamanho da célula em resposta aos fatores de crescimento e à disponibilidade de nutrientes e energia. A Ser/Thr- cinase **mTORC1,** altamente conservada, é ativada por fornecimento abundante de nutrientes e energia (tal como altas concentrações de aminoácidos de cadeia ramificada). Essa proteína, quando ativada, fosforila vários fatores de transcrição, levando ao aumento na expressão de genes que codificam enzimas da síntese de lipídeos e proliferação mitocondrial e aumento da biogênese de ribossomos (**Figura 23-40**). O jejum resulta na inativação de mTORC1, levando ao aumento da degradação de proteínas e glicogênio no fígado e no músculo e mobilização de triglicerídeos do tecido adiposo. A ativação crônica de mTORC1 por excesso de alimento resulta em deposição excessiva de triglicerídeos no tecido adiposo e também no fígado e músculo. Esse acúmulo anormal de lipídeos no fígado e no músculo pode contribuir para a insensibilidade à insulina e para o diabetes tipo 2, conforme descrito na Seção 23-5. Mutações que levam à produção de mTORC1 constantemente ativada são também comumente associadas com cânceres em humanos.

## A dieta regula a expressão de genes essenciais para a manutenção da massa corporal

As proteínas de uma família de fatores de transcrição ativados por ligantes, os **receptores ativados por proliferadores de peroxissomos** (**PPAR**, de *peroxisome proliferator-activated receptors*), respondem a mudanças nos lipídeos da dieta com a alteração da expressão de genes envolvidos no metabolismo de gorduras e de carboidratos. Esses fatores de transcrição foram reconhecidos inicialmente por seu papel na síntese de peroxissomos – daí

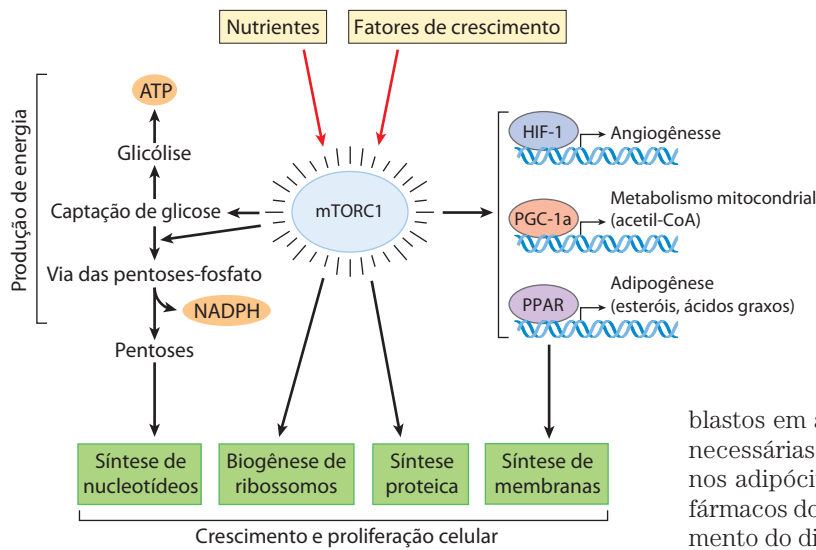



**FIGURA 23-40 mTORC1 estimula o crescimento e a proliferação celular quando a nutrição adequada está disponível.** mTORC1 é uma proteína-cinase Ser/Thr ativada por fatores de crescimento e metabólitos que sinalizam uma nutrição adequada. Pela fosforilação de proteínas-alvo essenciais, mTORC1 ativa a produção de energia (ATP e NADPH) para a biossíntese e estimula a síntese de proteínas e lipídeos, permitindo o crescimento e a proliferação celular.

seu nome. Seus ligantes normais são ácidos graxos ou seus derivados, mas também se ligam a agonistas sintéticos e podem ser ativados experimentalmente por manipulação genética. PPAR$\alpha$, PPAR$\delta$ e PPAR$\gamma$ são membros dessa superfamília de receptores nucleares. Eles agem no núcleo, formando heterodímeros com outro receptor nuclear, o RXR (receptor retinoide X, de *retinoid X receptor*), ligando-se a regiões reguladoras no DNA próximas aos genes sob seu controle e alterando a taxa de transcrição desses genes (**Figura 23-41**).

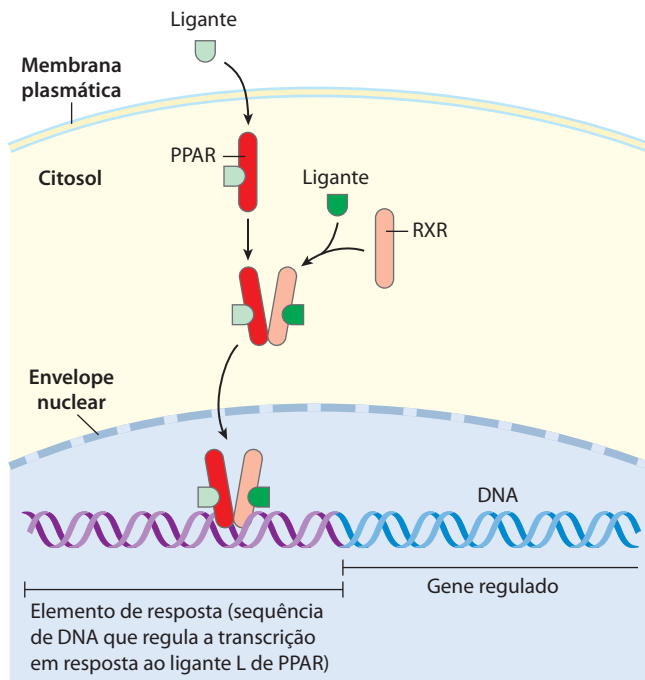



**FIGURA 23-41 Modo de ação dos PPAR.** Os PPAR são fatores de transcrição que, ao interagirem com seu ligante cognato (L), formam heterodímeros com o receptor nuclear RXR. O dímero se liga a regiões específicas do DNA, conhecidas como elementos de resposta, estimulando a transcrição dos genes destas regiões.

O **PPAR$\gamma$,** expresso principalmente no fígado e no tecido adiposo (marrom e branco), está envolvido na ativação de genes necessários para a diferenciação de fibroblastos em adipócitos, e de genes que codificam proteínas necessárias para a síntese e o armazenamento de lipídeos nos adipócitos (**Figura 23-42**). O PPAR$\gamma$ é ativado pelos fármacos do tipo tiazolidinedionas, que são usados no tratamento do diabetes tipo 2 (discutido adiante).

O **PPAR$\alpha$** é expresso no fígado, no rim, no coração, no músculo esquelético e no tecido adiposo marrom. Os ligantes que ativam esse fator de transcrição incluem os eicosanoides, os ácidos graxos livres e uma classe de fármacos chamados de fibratos, como o fenofibrato (TriCor) e o ciprofibrato (Modalim), usados no tratamento de doenças coronarianas por aumentarem a HDL e reduzirem os triacilgliceróis do sangue. Nos hepatócitos, o PPAR$\alpha$ ativa os genes necessários para a captação e a $\beta$-oxidação dos ácidos graxos e a formação dos corpos cetônicos durante o jejum.

O **PPAR$\delta$** e o **PPAR$\beta$** são reguladores-chave da oxidação das gorduras, que agem detectando alterações na dieta lipídica. O PPAR$\delta$ age no fígado e no músculo, estimulando a transcrição de, pelo menos, nove genes que codificam proteínas envolvidas na $\beta$-oxidação e na dissipação da energia por meio do desacoplamento das mitocôndrias. Camundongos normais superalimentados com dieta altamente lipídica acumulam quantidades massivas de gordura branca, e gotículas de gordura se acumulam no fígado. No entanto, quando o mesmo experimento de superalimentação é realizado com camundongos com PPAR$\delta$ geneticamente alterado para estar sempre ativo, o acúmulo de gordura não acontece. Em camundongos com receptor de leptina não funcional (*db/db*), o PPAR$\delta$ ativado impede o desenvolvimento da obesidade que, caso contrário, ocorreria. O estímulo pelo PPAR$\delta$ da degradação dos ácidos graxos em mitocôndrias desacopladas causa depleção das gorduras, perda de peso e termogênese. Visto dessa forma, a termogênese é tanto um meio do organismo se manter aquecido quanto uma defesa contra a obesidade. PPAR$\delta$ é, claramente, um alvo potencial para fármacos no tratamento da obesidade.

## O comportamento alimentar é influenciado a curto prazo por grelina e $PYY_{3\text{-}36}$

A **grelina** é um hormônio peptídico (28 aminoácidos) produzido pelas células que revestem o estômago. Originalmente, foi reconhecido como o estímulo para a liberação do hormônio do crescimento (*ghre* é a raiz protoindo-europeia de "crescer"); posteriormente, se mostrou um potente estimulante do apetite, que funciona em escala

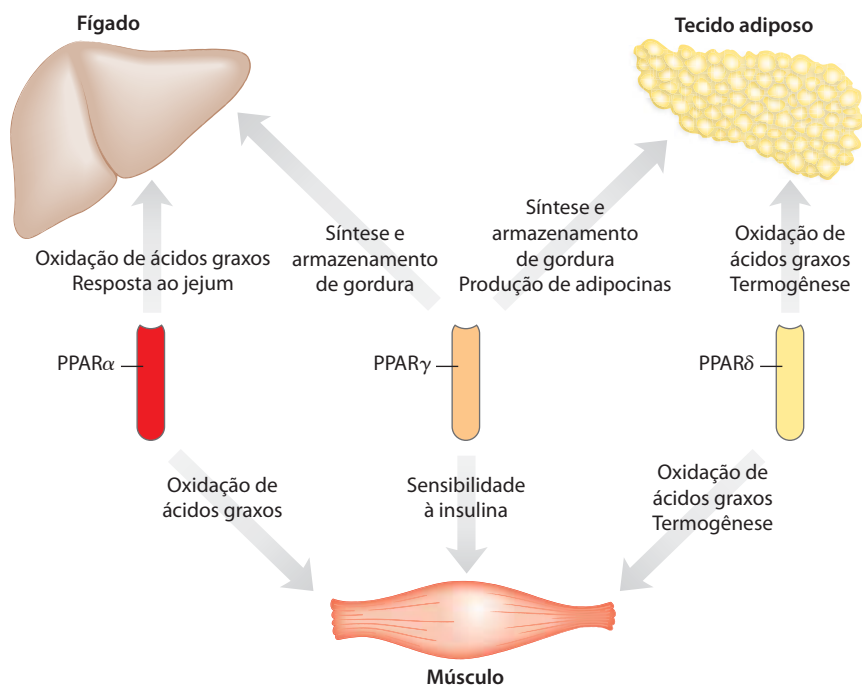
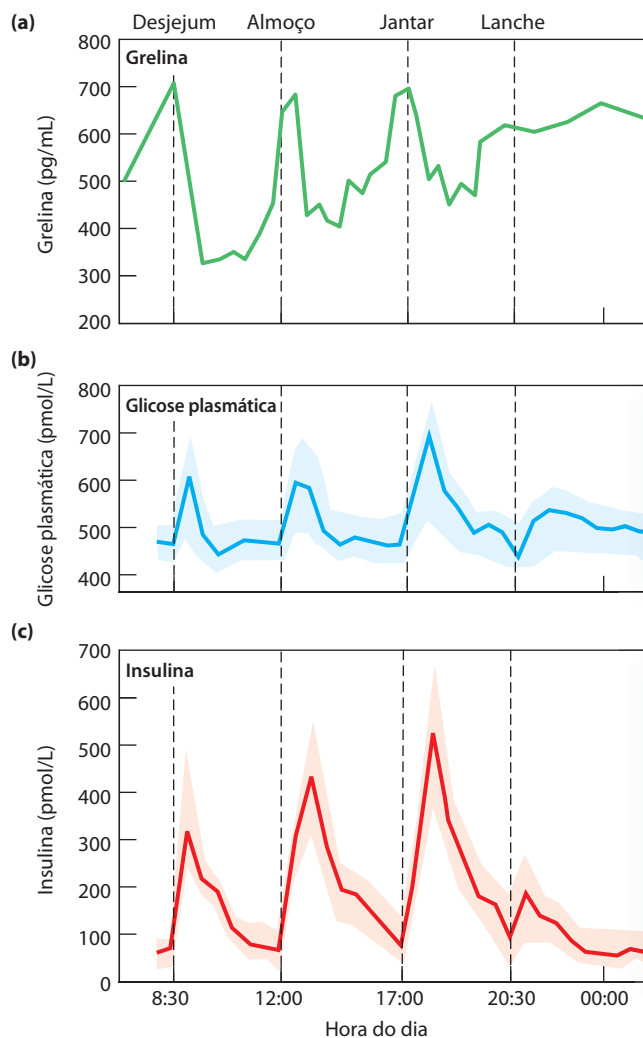



**FIGURA 23-42 Integração metabólica pelos PPAR.** As três isoformas do PPAR regulam a homeostasia da glicose e dos lipídeos por meio de seus efeitos coordenados sobre a expressão gênica no fígado, no músculo e no tecido adiposo. PPAR$\alpha$ e PPAR$\delta$ (e sua isoforma mais intimamente relacionada, PPAR$\beta$) regulam a utilização dos lipídeos; PPAR$\gamma$ regula o armazenamento dos lipídeos e a sensibilidade de vários tecidos à insulina.

de tempo mais curta (entre as refeições) do que a leptina e a insulina. Os receptores de grelina estão localizados na hipófise (provavelmente mediando a liberação do hormônio do crescimento) e no hipotálamo (afetando o apetite), bem como no músculo cardíaco e no tecido adiposo. A grelina atua por meio de um receptor acoplado à proteína G para gerar o segundo mensageiro $IP_3$, que controla sua ação. A concentração de grelina no sangue varia entre as refeições, atingindo um pico imediatamente antes da refeição e diminuindo rapidamente logo após (**Figura 23-43**). A injeção de grelina em humanos produz sensação imediata de intensa fome. Pessoas com a síndrome de Prader-Willi, cujos níveis de grelina no sangue são extremamente altos, têm apetite incontrolável, levando à extrema obesidade que, com frequência, resulta em morte antes dos 30 anos.

O **$PYY_{3-36}$** é um hormônio peptídico (2 resíduos Y aminoterminais mais 34 aminoácidos) secretado pelas células endócrinas que revestem o intestino delgado e o colo, em resposta à chegada do alimento vindo do estômago. O nível de $PYY_{3-36}$ no sangue aumenta após uma refeição e se mantém alto por algumas horas. Ele é levado pelo sangue para o núcleo arqueado, onde age nos neurônios orexigênicos, inibindo a liberação de NPY e reduzindo a fome (Figura 23-35). Humanos injetados com $PYY_{3-36}$ sentem pouca fome e se alimentam menos que o normal por cerca de 12 horas.

**FIGURA 23-43 Variação das concentrações sanguíneas de glicose, grelina e insulina com relação aos horários das refeições. (a)** Os níveis plasmáticos de grelina aumentam bruscamente imediatamente *antes* da hora normal das refeições (7 h desjejum, 12 h almoço, 17:30 h jantar) e diminuem rapidamente logo após as refeições, acompanhando a sensação subjetiva de fome. **(b)** Os níveis de glicose aumentam bruscamente após uma refeição, **(c)** seguidos imediatamente por um aumento dos níveis de insulina, em resposta ao aumento da concentração sanguínea da glicose.

### Os simbiontes microbianos do intestino influenciam no metabolismo energético e na adipogênese

Os indivíduos magros e os obesos têm diferentes combinações de simbiontes microbianos no intestino. A investigação dessa observação levou à descoberta que determinados microrganismos do intestino liberam produtos de fermentação, a saber, ácidos graxos de cadeia curta na forma de acetato, propionato, butirato e lactato, que entram na corrente sanguínea e desencadeiam mudanças metabólicas no tecido adiposo. O propionato, por exemplo, conduz a expansão da TAB por sua ação sobre os receptores acoplados à proteína G (GPR43 e GPR41) na membrana plasmática de vários tipos celulares, incluindo adipócitos. Esses receptores desencadeiam a diferenciação de células precursoras em adipócitos e inibem a lipólise em adipócitos já existentes, levando a um aumento na massa TAB-obesidade.

Esses achados sugerem abordagens possíveis para a prevenção da obesidade, envolvendo a alteração na composição da comunidade microbiana no intestino, tanto pela adição direta de espécies microbianas (probióticos) que não favorecem a adipogênese, como pela adição de nutrientes dietéticos (prebióticos) que favorecem a dominância dos micróbios probióticos. Por exemplo, determinados polímeros de frutose (frutanos) não digeridos pelos animais, favorecem essa comunidade microbiana em camundongos e levam a uma redução do armazenamento de gordura na TAB e no fígado (e a uma redução na sensibilidade à insulina associada com obesidade e deposição de lipídeos no fígado; ver adiante).

As células endócrinas presentes no revestimento do trato gastrintestinal secretam produtos – os peptídeos anorexigênicos $PYY_{3-36}$ e o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e o peptídeo orexigênico grelina – que modula a ingestão de alimento e o gasto de energia no animal. A interação com micróbios específicos, ou com seus produtos de fermentação no intestino, pode ser o gatilho para a liberação desses peptídeos. A investigação dos efeitos da dieta sobre os simbiontes microbianos do intestino, e dos efeitos dos produtos microbianos sobre o metabolismo e a adipogênese, pode levar a uma compreensão mais aprofundada dos efeitos da dieta e dos simbiontes microbianos sobre o desenvolvimento da obesidade e de suas sequelas patológicas, a síndrome metabólica e o diabetes tipo 2.

Provavelmente, esse sistema interligado de controles neuroendócrinos da ingestão de alimento e do metabolismo evoluiu como proteção contra a fome e para eliminar o acúmulo contraproducente de gordura (obesidade extrema). A dificuldade que a maioria das pessoas encontra na tentativa de perder peso é prova da admirável efetividade desses controles.

**RESUMO 23.4 Obesidade e regulação da massa corporal**

- A obesidade está se tornando comum nos Estados Unidos e em outros países desenvolvidos, e predispõe a população a várias condições que ameaçam a vida, incluindo doença cardiovascular e diabetes tipo 2.
- O tecido adiposo produz leptina, hormônio que regula o comportamento alimentar e o gasto de energia de forma a manter as reservas adequadas de gordura. A produção e a liberação de leptina aumentam com o número e o tamanho dos adipócitos.
- A leptina age em receptores no núcleo arqueado do hipotálamo, causando a liberação dos peptídeos anorexigênicos (supressores de apetite), incluindo o $\alpha$-MSH, que age no cérebro de modo a inibir o comportamento alimentar. A leptina também estimula a ação do sistema nervoso simpático sobre os adipócitos, levando ao desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial, com consequente termogênese.
- O mecanismo de transdução de sinal da leptina envolve a fosforilação do sistema JAK-STAT. Fosforiladas pela JAK, as STAT se ligam a regiões reguladoras no DNA nuclear e alteram a expressão de genes que codificam proteínas que ajustam o nível da atividade metabólica e determinam o comportamento alimentar. A insulina age em receptores no núcleo arqueado, com resultados semelhantes aos causados pela leptina.
- O hormônio adiponectina estimula a captação e a oxidação de ácidos graxos e inibe sua síntese. Ele também sensibiliza o músculo e o fígado à insulina. As ações da adiponectina são mediadas pela AMPK, que também é ativada por baixa [AMP] e exercício.
- A grelina, hormônio produzido no estômago, age sobre neurônios orexigênicos (estimulantes do apetite) no núcleo arqueado, provocando fome antes de uma refeição. O $PYY_{3-36}$, um hormônio peptídico do intestino, age no mesmo local para reduzir a fome após uma refeição.
- Os tipos específicos de simbiontes microbianos no intestino podem influenciar a adipogênese, o aumento na massa da gordura corporal.

## 23.5 Obesidade, síndrome metabólica e diabetes tipo 2

No mundo industrializado, onde a oferta de alimentos é mais do que suficiente, existe uma crescente epidemia de obesidade e de diabetes tipo 2 associado a ela. Em torno de 300 milhões de pessoas em todo o mundo têm diabetes atualmente e projeções razoáveis predizem um aumento drástico no número de casos na próxima década, em consequência da epidemia mundial de obesidade. A patologia do diabetes inclui doença cardiovascular, insuficiência renal, cegueira, restabelecimento insatisfatório das extremidades que requerem amputações e neuropatia. No ano 2011, a mortalidade global devido ao diabetes foi estimada em 4 milhões, um número que, com certeza, aumentará nos próximos anos. É essencial compreender o diabetes tipo 2 e sua relação com a obesidade, e encontrar medidas defensivas que previnam ou revertam os danos causados por essa doença. ■

### No diabetes tipo 2, os tecidos se tornam insensíveis à insulina

A característica do diabetes tipo 2 é o desenvolvimento de resistência à insulina: estado no qual é necessário mais insulina para realizar os mesmos efeitos biológicos produzidos no estado sadio normal por uma quantidade

mais baixa do hormônio. Nos estágios iniciais da doença, as células $\beta$ pancreáticas secretam insulina suficiente para superar a sensibilidade reduzida ao hormônio apresentada pelo músculo e pelo fígado. As células $\beta$, porém, finalmente falham, e a falta de insulina torna-se aparente pela incapacidade do corpo de regular a glicose sanguínea. O estágio intermediário que precede o diabetes tipo 2 é, às vezes, denominado **síndrome metabólica**, ou **síndrome X**. Essa síndrome é caracterizada por obesidade, especialmente no abdome; hipertensão (pressão sanguínea alta); lipídeos sanguíneos anormais (altos TAG e LDL, baixa HDL); glicose sanguínea levemente elevada; e uma capacidade reduzida de remover a glicose sanguínea em um teste de tolerância à glicose. As pessoas com síndrome metabólica apresentam, com frequência, alterações nas proteínas sanguíneas, associadas com coagulação anormal (alta concentração de fibrinogênio) ou inflamação (alta concentração de peptídeo C reativo, a qual aumenta com a resposta inflamatória). Cerca de 27% da população adulta nos Estados Unidos apresentam esses sintomas da síndrome metabólica.

O que predispõe os indivíduos com síndrome metabólica a desenvolver diabetes tipo 2? De acordo com a hipótese da "toxicidade lipídica" (**Figura 23-44**), a ação do PPAR$\gamma$ sobre os adipócitos normalmente mantém as células preparadas para sintetizar e armazenar triacilgliceróis – os adipócitos são sensíveis à insulina e produzem leptina, o que leva à deposição intracelular contínua de TAG. Contudo, o excesso de ingestão calórica em pessoas obesas faz os adipócitos ficarem repletos de TAG, tornando o tecido adiposo incapaz de receber uma demanda aumentada para estocar TAG. O tecido adiposo repleto de lipídeos libera fatores proteicos que atraem macrófagos que se infiltram no tecido e podem chegar a representar, em massa, até 50% do tecido adiposo. Os macrófagos desencadeiam a resposta inflamatória, que prejudica a deposição dos ácidos graxos nos adipócitos e favorece sua liberação para o sangue. Esse excesso de ácidos graxos entra nas células hepáticas e musculares, onde é convertido em TAG que se acumulam como gotículas lipídicas. Essa deposição ectópica (do grego *ektopos*, "fora de lugar") de TAG leva à insensibilidade à insulina no fígado e no músculo, a característica do diabetes tipo 2. Além disso, de acordo com essa hipótese, ácidos graxos e TAG em excesso são tóxicos para o fígado e o músculo. Algumas pessoas são menos adaptadas geneticamente para lidar com essa carga de lipídeos ectópicos, sendo mais suscetíveis ao dano celular que leva ao desenvolvimento do diabetes tipo 2. A resistência à insulina provavelmente envolve prejuízo de vários mecanismos pelos quais o hormônio atua no metabolismo, que incluem alterações nos níveis proteicos e alterações nas atividades das enzimas de sinalização e dos fatores de

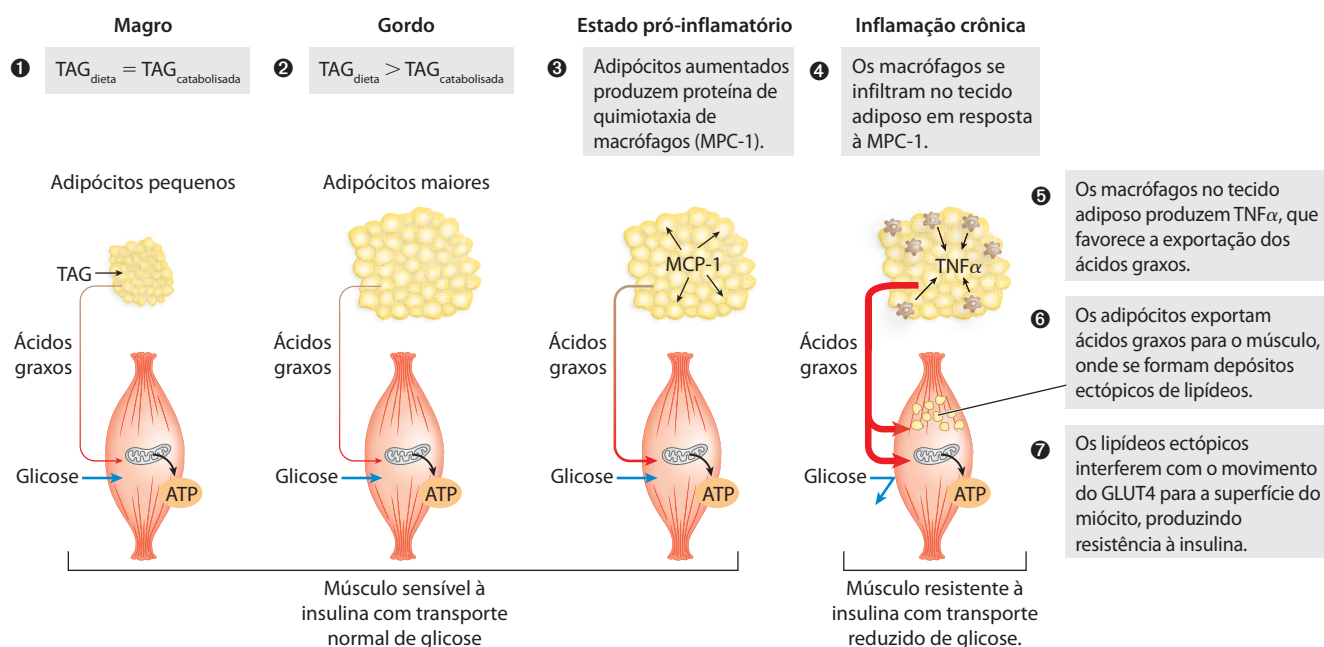



**FIGURA 23-44 A sobrecarga de triglicerídeos nos adipócitos desencadeia inflamação do tecido adiposo, deposição ectópica de lipídeos e resistência à insulina no músculo.** Em um indivíduo com massa corporal saudável, a captação do triacilglicerol (TAG) da dieta iguala sua oxidação para produção de energia. Em indivíduos com sobrepeso, o excesso de ingestão calórica resulta em adipócitos aumentados, repletos de TAG e incapazes de estocar mais. Os adipócitos aumentados secretam MCP-1 (proteína-1 de quimiotaxia de monócitos), e atraem macrófagos. Estes se infiltram no tecido adiposo e produzem TNF-$\alpha$ (fator $\alpha$ de necrose tumoral), que desencadeia degradação dos lipídeos e liberação dos ácidos graxos na corrente sanguínea. Os ácidos graxos liberados do tecido adiposo entram nas células musculares, onde se acumulam como pequenas gotículas de gordura. Este armazenamento ectópico de lipídeos de alguma forma causa resistência à insulina, talvez por engatilhar proteína-cinases ativadas por lipídeos que inativam algum elemento da via de sinalização da insulina. Os transportadores de glicose GLUT4 deixam a superfície da célula muscular, impedindo a entrada da glicose no músculo; os miócitos tornam-se resistentes à insulina e, por isso, não podem usar a glicose sanguínea como combustível, de modo que os ácidos graxos são mobilizados do tecido adiposo e tornam-se o combustível principal. O influxo de ácidos graxos aumentado no músculo leva a uma deposição ectópica de lipídeos. Em alguns indivíduos a resistência à insulina evolui para diabetes tipo 2. Outros indivíduos são geneticamente menos suscetíveis aos efeitos deletérios da deposição ectópica de lipídeos ou são geneticamente mais equipados para lidar com essa deposição e não desenvolvem o diabetes.

transcrição. Por exemplo, tanto a síntese de adiponectina pelos adipócitos como seus níveis sanguíneos decrescem com a obesidade, e aumentam com a perda de peso.

Sabe-se que vários fármacos efetivos no aumento da sensibilidade à insulina no diabetes tipo 2 agem sobre proteínas específicas nas vias de sinalização, e seus efeitos são consistentes com o modelo de lipotoxicidade. As tiazolidinedionas se ligam ao PPAR$\gamma$, ativando um conjunto de genes específicos de adipócitos e promovendo a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos pequenos, aumentando a capacidade corporal de absorver ácidos graxos da dieta e de armazená-los como TAG.

Existem fatores genéticos que claramente predispõem para o diabetes tipo 2. Embora 80% das pessoas com diabetes tipo 2 sejam obesas, a maioria das pessoas obesas não desenvolve a doença. Devido à complexidade dos mecanismos reguladores que foram discutidos neste capítulo, não é surpreendente que a genética do diabetes seja complexa, envolvendo interações entre genes variantes e fatores ambientais, incluindo dieta e estilo de vida. Pelo menos 10 *loci* genéticos já foram implicados com o diabetes tipo 2; variações isoladas em qualquer desses "diabetogenes" causam um aumento relativamente pequeno na probabilidade de desenvolver a doença. Por exemplo, pessoas com PPAR$\gamma$ variante no qual um resíduo de Ala substitui uma Pro na posição 12 têm um aumento leve, embora significativo, no risco de desenvolver a doença. ■

## O diabetes tipo 2 é controlado com dieta, exercício e medicação

Os estudos mostram que três fatores aumentam a saúde das pessoas com diabetes tipo 2: restrição alimentar, exercício regular e fármacos que aumentam a produção de insulina ou a sensibilidade ao hormônio. A restrição alimentar (e a perda de peso que a acompanha) reduz a carga total de ácidos graxos controláveis. A composição lipídica da dieta influencia, por meio dos PPAR e outros fatores de transcrição, a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na oxidação dos ácidos graxos e no gasto de energia via termogênese. O exercício ativa a AMPK, como o faz a adiponectina; a AMPK altera o metabolismo no sentido da oxidação da gordura e ao mesmo tempo inibe sua síntese.

Várias classes de fármacos são utilizados no manejo do diabetes tipo 2, alguns dos quais já foram previamente discutidos no capítulo (Tabela 23-7). As sulfonilureias agem sobre os canais de $K^+$ controlados por ATP em células $\beta$ pancreáticas e estimulam a liberação de insulina. Biguanidas como a metformina (Glicofage) ativam a AMPK, mimetizando os efeitos da adiponectina. As tiazolidinedionas agem por meio de PPAR$\gamma$, aumentando a concentração de adiponectina no plasma e estimulando a diferenciação dos adipócitos, de forma a aumentar a capacidade de armazenamento de TAG. Os inibidores da protease IV de dipeptídeos (DPP IV, de *dipeptide protease IV*) previnem a degradação proteolítica do GLP-1, hormônio peptídico produzido no intestino e que estimula a secreção pancreática de insulina. A inibição da peptidase prolonga a ação do GLP-1, aumentando efetivamente a secreção da insulina.

A combinação entre perda de peso e exercício é a forma recomendada para *prevenir* o desenvolvimento da síndrome metabólica e do diabetes tipo 2. Resultados recentes relacionados com TAM em adultos sugerem uma possibilidade interessante para ajudar na perda de peso e na redução da quantidade de TAG que deve ser armazenada. A proteína PRDM16 tem uma alta expressão no tecido adiposo marrom, e talvez unicamente nesse tecido. A PRDM16, quando superexpressada no tecido adiposo de camundongos, induz a diferenciação de pré-adipócitos do tecido adiposo branco em adipócitos *marrons*, com altos níveis de termogenina e respiração desacoplada. Tais células, em princípio, podem consumir ácidos graxos acima da quantidade necessária para a produção de ATP, conver-

**TABELA 23-7** Tratamentos para o diabetes melito tipo 2

| Intervenção/tratamento | Alvo direto | Efeito do tratamento |
|---|---|---|
| Perda de peso | Tecido adiposo; reduz conteúdo de TAG | Reduz a carga lipídica; aumenta a capacidade de armazenamento lipídico no tecido adiposo; restaura a sensibilidade à insulina |
| Exercício | AMPK, ativada pelo aumento de [AMP]/[ATP] | Auxilia na perda de peso ver Figura 23-39; |
| Sulfonilureias: glipizida (Glucotrol), gliburida (várias marcas), glimepirida (Amaryl) | Células $\beta$ pancreáticas; canais de $K^+$ bloqueados | Estimula a secreção de insulina pelo pâncreas; ver Figura 23-27 |
| Biguanidas: metformina (Glicofage) | AMPK, ativada | Aumenta a captação da glicose pelo músculo; reduz a produção de glicose no fígado |
| Tiazolidinedionas: troglitazona (Rezulin),* rosiglitazona (Avandia),† pioglitazona (Actos) | PPAR$\gamma$ | Estimula a expressão de genes, potencializando a ação da insulina no fígado, no músculo e no tecido adiposo; aumenta a captação de glicose; reduz a síntese de glicose no fígado |
| Moduladores de GLP-1: exenatida (Byetta), sitagliptina (Januvia) | Peptídeo-1 do tipo glucagon, protease IV de dipeptídeo | Intensifica a secreção de insulina pelo pâncreas |

*Voluntariamente retirada do mercado devido aos efeitos colaterais.
† Prescrições restritas a pacientes que não respondem a outros tratamentos devido ao possível aumento de risco de doença cardiovascular.

tendo em calor a energia da oxidação. Dada a difusão e a ocorrência aumentada do diabetes tipo 2, a possibilidade de estimular a oxidação das gorduras pela ativação do TAM certamente merece ser explorada. ■

## RESUMO 23.5 Obesidade, síndrome metabólica e diabetes tipo 2

- A síndrome metabólica, que inclui obesidade, hipertensão, lipídeos sanguíneos elevados e resistência à insulina, frequentemente é o prelúdio do diabetes tipo 2.
- A resistência à insulina que caracteriza o diabetes tipo 2 pode ser uma consequência do armazenamento anormal de lipídeos no músculo e no fígado, em resposta a uma ingestão lipídica que não pode ser acomodada no tecido adiposo.
- A expressão de enzimas para síntese lipídica está sob regulação firme e complexa. Os PPAR são fatores de transcrição que determinam a taxa de síntese de muitas enzimas envolvidas no metabolismo lipídico e na diferenciação dos adipócitos.
- Os tratamentos efetivos do diabetes tipo 2 incluem exercício, dieta adequada e fármacos que aumentem a produção de insulina ou a sensibilidade ao hormônio.

## Termos-chave

*Os termos em negrito estão definidos no glossário.*



## Leituras adicionais

### Conteúdo geral e história

**Blumenthal, S.** (2009) The insulin immunoassay after 50 years: a reassessment. *Perspect. Biol. Med.* **52**, 343–354.
Fascinante relato histórico sobre o desenvolvimento do radioimunoensaio por Yalow e Berson e o seu uso nos estudos da insulina e diabetes.

**Chew, S.L. & Leslie, D.** (2006) *Clinical Endocrinology and Diabetes: An Illustrated Colour Text*, Churchill Livingstone, Edinburgh.

**Schmidt, T.J.** (2010) Biochemistry of hormones. In *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, 7th edn (Devlin, T.M., ed.), pp. 883–938, John Wiley & Sons, Inc., New York.

### Metabolismo específico para cada tecido

**Brosnan, J.T. & and Brosnan, M.E.** (2007) Creatine: endogenous metabolite, dietary, and therapeutic supplement. *Annu. Rev. Nutr.* **27**, 241–261.

**Cannon, B. & Nedergaard, K.** (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* **84**, 277–359.

**Elia, M.** (1995) General integration and regulation of metabolism at the organ level. *Proc. Nutr. Soc.* **54**, 213–234.

**Enerbäck, S.** (2010) Human brown adipose tissue (minireview). *Cell Metab.* **11**, 248–252.

**Randle, P.J.** (1995) Metabolic fuel selection: general integration at the whole-body level. *Proc. Nutr. Soc.* **54**, 317–327.

**Ravussin, E. & Galgani, J.E.** (2011) The implication of brown adipose tissue for humans. *Annu. Rev. Nutr.* **31**, 33–37.

### Regulação hormonal do metabolismo energético

**Cahill, G.F., Jr.** (2006) Fuel metabolism in starvation. *Annu. Rev. Nutr.* **26**, 1–22.

**Desvergne, B., Michalik, L., & Wahli, W.** (2006) Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* **86**, 465–514.

**Feige, J.N. & Auwerx, J.** (2007) Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis. *Trends Cell Biol.* **17**, 292–301.

**Hardie, D.G. & Sakamoto, K.** (2006) AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology* **21**, 48–60.

**Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., & Tobe, K.** (2006) Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* **116**, 1784–1792.

**Kola, B., Boscaro, M., Rutter, G.A., Grossman, A.B., & Korbonits, M.** (2006) Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol. Metab.* **17**, 205–215.

**Kraemer, D.K., Al-Khalili, L., Guigas, B., Leng, Y., Garcia-Roves, P.M., & Krook, A.** (2007) Role of AMP kinase and PPARδ in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **282**, 19,313–19,320.

**Lin, H.V. & Accill, D.** (2011) Hormonal regulation of hepatic glucose production in health and disease. *Cell Metab.* **14**, 9–19.
Revisão avançada sobre os mecanismos que regulam a produção da glicose pelo fígado.

**Maccarrone, M., Gasperi, V., Catani, M.V., Diep, T.A., Dainese, E., Hansen, H.S., & Avigliano, L.** (2010) The endocannabinoid system and its relevance for nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* **30**, 423–440.

**Nguyen, A.D., Herzog, H., & Sainsbury, A.** (2011) Neuropeptide Y and peptide YY: important regulators of energy metabolism. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* **18**, 56–60.
Estudo de nível intermediário sobre os efeitos de NPY e PYY no metabolismo de energia no cérebro de ratos.

**Nichols, C.G.** (2006) $K_{ATP}$ channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* **440**, 470–476.

## Controle da massa corporal

**Ahima, R.S.** (2005) Central actions of adipocyte hormones. *Trends Endocrinol. Metab.* **16**, 307–313.
Redução na leptina é um sinal importante para a mudança do estado alimentado para o estado de jejum.

**Ahima, R.S.** (2006) Ghrelin—a new player in glucose homeostasis? *Cell Metab.* **3**, 301–307.

**Azzu, V. & Brand, M.D.** (2010) The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 298–307.
Revisão de nível intermediário sobre como o frio, o excesso de comida e a inanição afetam a expressão dos genes da termogenina.

**Biddinger, S.B. & Kahn, C.R.** (2006) From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 123–158.
Revisão da estrutura, da função e do papel das proteínas desacopladoras.

**Delzenne, N.M. & Cani, P.D.** (2011) Interaction between obesity and the gut microbiota: relevance in nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* **31**, 15–31.

**Friedman, J.M.** (2002) The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr. Rev.* **60**, S1–S14.
Revisão de nível intermediário de todos os aspectos da biologia da leptina.

**Howell, J.J. & Manning, B.D.** (2011) mTOR couples cellular nutrient sensing to metabolic homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* **22**, 94–102.
Revisão de nível intermediário sobre como MTORC1 controla as respostas metabólicas às flutuações na disponibilidade de nutrientes.

**Jequier, E. & Tappy, L.** (1999) Regulation of body weight in humans. *Physiol. Rev*. **79**, 451–480.
Revisão detalhada do papel da leptina na regulação da massa corporal e no controle da ingestão de alimento e dos papéis dos tecidos adiposos branco e marrom no gasto da energia.

**Klok, M.D., Jakobsdottir, S., & Drent, M.L.** (2007) Role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight. *Obes. Rev.* **8**, 21–34.

**Marx, J.** (2003) Cellular warriors at the battle of the bulge. *Science* **299**, 846–849.
Sucinta revisão da bioquímica do controle do peso e introdução a diversos artigos no mesmo número da *Science* sobre a obesidade em humanos.

**Morton, G.J., Cummings, D.E., Baskin, D.G., Barsh, G.S., & Schwartz, M.W.** (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* **443**, 289–295.

**Zoncu, R., Efeyan, A., & Sabatini, D.M.** (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 21–35.

## Obesidade, síndrome metabólica e diabetes tipo 2

**Attie, A.D. & Scherer, P.E.** (2009) Adipocyte metabolism and obesity. *J. Lipid Res.* **50**, S395–S399.

**Barish, G.D., Narkar, V.A., & Evans, R.M.** (2006) PPARδ: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* **116**, 590–597.

**Clee, S.M. & Attie, A.D.** (2007) The genetic landscape of type 2 diabetes in mice. *Endocrinol. Rev.* **28**, 48–83.

**Cypess, A.M. & Kahn, C.R.** (2010) Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* **17**, 143–149.
Discussão de nível intermediário sobre a possibilidade de estimular a oxidação da gordura no TAM como tratamento da obesidade.

**Guilherme, A., Virbasius, J.V., Puri, V., & Czech, M.P.** (2008) Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 367–377.

**Harper, M.E., Green, K., & Brand, M.D.** (2008) The efficiency of cellular energy transduction and its implications for obesity. *Annu. Rev. Nutr.* **28**, 13–33.

**Kasuga, M.** (2006) Insulin resistance and pancreatic β cell failure. *J. Clin. Invest.* **116**, 1756–1760.
Introdução a uma série de revisões sobre o diabetes tipo 2 neste número da revista.

**Klein, J., Perwitz, N., Kraus, D., & Fasshauer, M.** (2006) Adipose tissue as source and target for novel therapies. *Trends Endocrinol. Metab.* **17**, 26–32.
Revisão de nível intermediário.

**Lusis, A.J., Attie, A.D., & Reue, K.** (2008) Metabolic syndrome: from epidemiology to systems biology. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 819–830.

**McAllister, E.J., Dhurandhar, N.V., Keith, S.W., Aronne, L.J., Barger, J., Baskin, M., Benca, R.M., Biggio, J., Boggiano, M.M., Eisenmann, J.C., et al.** (2009) Ten putative contributors to the obesity epidemic. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **49**, 868–913.
Revisão extensa e avançada dos fatores responsáveis pela epidemia mundial de obesidade.

**Muoio, D.M. & Newgard, C.B.** (2008) Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β-cell failure in diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 193–205.

**Savage, D.B., Petersen, K.F., & Shulman, G.I.** (2007) Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol. Rev.* **87**, 507–520.

**Semple, R.K., Chatterjee, V.K.K., & O'Rahilly, S.** (2006) PPARγ and human metabolic disease. *J. Clin. Invest.* **116**, 581–589.

**Sharma, A.M. & Staels, B.** (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor γ and adipose tissue—understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 386–395.

**Verdin, E., Hirschey, M.D., Finley, L.W., & Haigis, M.C.** (2010) Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 669–675.

**Vidal-Puig, A., & Unger, R.H. (2010).** *Biochim. Biophys. Acta,* **180**, 207–208.
Este exemplar inteiro do periódico trata da lipotoxicidade e da síndrome metabólica.

**Virtue, S. & Vidal-Puig, A.** (2008) It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *PLoS Biol.*, **6**, e237. (doi:10.1371/journal.pbio.0060237)

**Voight, B.F., Scott, L.J., Steinthorsdottir, V., Morris, A.P., Dina C., Welch, R.P., Zeggini, E., Huth, C., Aulchenko, Y.S., Thorleifsson, G., et al.** (2010) Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat. Genet.* **42**, 579–589.

Resultados de uma grande pesquisa (47.000 indivíduos) para identificar genes que predispõe os humanos ao diabetes tipo 2.

**Whittle, A.J., Lopez, M., & Vidal-Puig, A.** (2011) Using brown adipose tissue to treat obesity—the central issue. *Trends Mol. Med.* **8**, 405–411.

Revisão de nível intermediário sobre a possibilidade de tratar a obesidade pela estimulação da atividade da gordura marrom.

**Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., & Chen, H.** (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **112**, 1821–1830.

## Problemas

**1. Atividade dos hormônios peptídicos.** Explique como dois hormônios peptídicos tão semelhantes estruturalmente quanto a ocitocina e a vasopressina podem ter efeitos tão diversos (ver Figura 23-9).

**2. ATP e fosfocreatina como fontes de energia para o músculo.** Durante a contração muscular, a concentração de fosfocreatina no músculo esquelético diminui, enquanto a concentração de ATP permanece razoavelmente constante. No entanto, em um experimento clássico, Robert Davies descobriu que, se tratasse primeiro o músculo com 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (p. 98), a concentração de ATP declinaria rapidamente, enquanto a concentração de fosfocreatina permaneceria constante durante uma série de contrações. Sugira uma explicação.

**3. Metabolismo do glutamato no cérebro.** O tecido cerebral capta glutamato do sangue, o transforma em glutamina e libera a glutamina no sangue. Qual o resultado dessa conversão metabólica? Como ela ocorre? A quantidade de glutamina produzida no cérebro pode, na verdade, exceder a quantidade de glutamato que ali chega a partir do sangue. Como surge essa glutamina extra? (Dica: você pode querer revisar o catabolismo dos aminoácidos no Capítulo 18; lembre-se de que o $NH_4^+$ é muito tóxico para o cérebro.)

**4. As proteínas como combustível durante o jejum.** Quando as proteínas musculares são catabolizadas no músculo esquelético durante um jejum, quais os destinos dos aminoácidos?

**5. Ausência da glicerol-cinase no tecido adiposo.** O glicerol-3-fosfato é necessário para a biossíntese de triacilgliceróis. Os adipócitos, células especializadas na síntese e na degradação de triacilgliceróis, não podem utilizar o glicerol diretamente, pois não têm a glicerol-cinase, que catalisa a reação

$$\text{Glicerol} + \text{ATP} \rightarrow \text{glicerol-3-fosfato} + \text{ADP}$$

Como o tecido adiposo obtém o glicerol-3-fosfato necessário para a síntese de triacilgliceróis?

**6. Consumo de oxigênio durante o exercício.** Um adulto sedentário consome cerca de 0,05 L de $O_2$ em 10 segundos. Um atleta, ao correr 100 m rasos, consome cerca de 1 L de $O_2$ em 10 segundos. Ao final da corrida, este corredor continua a respirar rapidamente (embora a frequência vá declinando) por alguns minutos, consumindo 4 L extras de $O_2$ acima do total consumido pela pessoa sedentária.

(a) Por que a necessidade de $O_2$ aumenta tanto durante a corrida?

(b) Por que a demanda por $O_2$ permanece alta após o final da corrida?

**7. Deficiência de tiamina e função cerebral.** Pessoas com deficiência de tiamina apresentam alguns sinais e sintomas neurológicos característicos, incluindo perda dos reflexos, ansiedade e confusão mental. Por que a deficiência de tiamina se manifesta por alterações na função cerebral?

**8. Potência dos hormônios.** Em condições normais, a medula suprarrenal humana secreta adrenalina ($C_9H_{13}NO_3$) em uma taxa suficiente para manter uma concentração de $10^{-10}$ M no sangue circulante. Para apreciar o que significa tal concentração, calcule, para uma piscina redonda com uma profundidade de água de 2 m, qual o diâmetro necessário para dissolver 1,0 g (cerca de uma colher de chá) de adrenalina para a concentração igualar-se à do sangue.

**9. Regulação dos níveis hormonais no sangue.** A meia-vida da maioria dos hormônios no sangue é relativamente curta. Por exemplo, quando insulina radioativamente marcada é injetada em um animal, metade do hormônio marcado desaparece do sangue em 30 min.

(a) Qual a importância da inativação relativamente rápida dos hormônios circulantes?

(b) Em vista dessa rápida inativação, como é mantido constante o nível do hormônio circulante em condições normais?

(c) De que modo o organismo pode estabelecer rápidas mudanças no nível de um hormônio circulante?

**10. Hormônios hidrossolúveis *versus* hormônios lipossolúveis.** Com base em suas propriedades físicas, os hormônios se dividem em duas categorias: aqueles muito solúveis em água, mas relativamente insolúveis em lipídeos (p. ex., a adrenalina) e aqueles relativamente insolúveis em água, mas altamente solúveis em lipídeos (p. ex., os hormônios esteroides). Em seu papel como reguladores da atividade celular, a maior parte dos hormônios hidrossolúveis não entra em suas células-alvo. Os hormônios lipossolúveis, por sua vez, entram em suas células-alvo e, por fim, atuam no núcleo. Qual a correlação entre solubilidade, localização dos receptores e modo de ação dessas duas classes de hormônios?

**11. Diferenças metabólicas entre o músculo e o fígado em situação de "luta ou fuga".** Quando um animal confronta-se com uma situação de luta ou fuga, a liberação de adrenalina promove a degradação de glicogênio no fígado, no músculo esquelético e no músculo cardíaco. O produto final da degradação de glicogênio no fígado é a glicose; o produto final no músculo esquelético é o piruvato.

(a) Qual a razão para haver diferentes produtos da degradação do glicogênio nos dois tecidos?

(b) Qual a vantagem, para um animal que deve lutar ou fugir, dessas vias específicas de degradação do glicogênio?

**12. Secreção excessiva de insulina: o hiperinsulinismo.** Certos tumores malignos do pâncreas causam produção excessiva de insulina nas células $\beta$. Pessoas afetadas apresentam tremores, fraqueza e fadiga, sudorese e fome.

(a) Qual o efeito do hiperinsulinismo sobre o metabolismo de carboidratos, aminoácidos e lipídeos no fígado?

(b) Quais as causas dos sintomas observados? Sugira a razão pela qual essa condição, se prolongada, leva a dano cerebral.

**13. Termogênese causada por hormônios da tireoide.** Os hormônios da tireoide estão intimamente envolvidos na regulação da taxa metabólica basal. Tecido hepático de animais que receberam excesso de tiroxina mostra aumento no consumo de $O_2$ e na produção de calor (termogênese), mas a concentração de ATP no tecido é normal. Existem diferentes explicações para o efeito termogênico da tiroxina. Uma delas é que o excesso de tiroxina causa desacoplamento da fosforilação oxidativa na mitocôndria. Como pode tal efeito explicar as observações? Outra explicação sugere que a termogênese deva-se a um aumento na utilização do ATP no tecido estimulado pela tiroxina. Essa explicação é razoável? Por quê?

**14. Função dos pró-hormônios.** Quais são as possíveis vantagens de sintetizar hormônios como pró-hormônios?

**15. Fontes de glicose durante o jejum.** Um adulto humano típico usa cerca de 160 g de glicose por dia, dos quais 120 g são usadas pelo cérebro. A reserva de glicose disponível (~20 g de glicose circulante e ~190 g de glicogênio) é adequada para cerca de um dia. Após a reserva ser depletada pelo jejum, como o corpo obtém glicose?

**16. Camundongos parabióticos *ob/ob*.** Pesquisadores podem conectar os sistemas circulatórios de dois camundongos por meio de uma cuidadosa cirurgia, de modo que o mesmo sangue circula em ambos os animais. Nesses camundongos **parabióticos**, os produtos liberados no sangue por um animal atingem o outro animal via circulação compartilhada. Ambos os animais são livres para comer de forma independente. Se um camundongo mutante *ob/ob* (ambas as cópias do gene *OB* são defeituosas) e um camundongo normal *OB/OB* (duas cópias boas do gene *OB*) são unidos tornando-se parabióticos, o que ocorre com o peso de cada camundongo?

**17. Cálculo do índice de massa corporal.** Um corpulento professor de bioquímica pesa 118 kg e tem altura de 1,73 cm. Qual o índice de massa corporal desse professor? Quantos kg ele teria de perder para atingir um índice de massa corporal de 25 (normal)?

**18. Secreção de insulina.** Na sua opinião, quais os efeitos da exposição de células $\beta$ pancreáticas ao ionóforo de potássio valinomicina (Figura 11-44) sobre a secreção de insulina? Explique.

**19. Efeitos de um receptor de insulina deletado.** Observa-se que uma linhagem de camundongos, sem o receptor específico de insulina hepático, apresenta moderada hiperglicemia de jejum (glicemia de 132 mg/dL, em comparação com 101 mg/dL nos controles) e hiperglicemia mais marcante no estado alimentado (glicemia de 363 mg/dL, em comparação com 135 mg/dL nos controles). Os camundongos apresentam níveis de glicose-6-fosfatase acima do normal no fígado e níveis elevados de insulina no sangue. Explique essas observações.

**20. Decisões sobre a segurança do uso de fármacos.** O fármaco Avandia (rosiglitazona) é efetivo para a redução da glicose sanguínea em pacientes com diabetes tipo 2, mas também parece envolver um risco aumentado de infarto do miocárdio. Se fosse sua responsabilidade decidir se esse fármaco deve permanecer no mercado (marcado com avisos adequados quanto a seus efeitos colaterais) ou deve ser retirado, quais fatores levaria em conta ao tomar sua decisão?

**21. Medicação para o diabetes tipo 2.** Os fármacos acarbose e miglitol, utilizados no tratamento do diabetes melito tipo 2, inibem $\alpha$-glicosidases da membrana em forma de escova do intestino delgado. Essas enzimas degradam oligossacarídeos resultantes da digestão do glicogênio ou do amido em monossacarídeos. Sugira um possível mecanismo para o efeito salutar desses fármacos em pessoas com diabetes. Quais efeitos colaterais, se for o caso, você esperaria desses fármacos? Por quê? (Dica: revise a intolerância à lactose, p. 561-562.)

## Problema de análise de dados

**22. Clonando o receptor de sulfonilureias nas células $\beta$ pancreáticas.** A gliburida, membro da família das sulfonilureias mostrada na p. 955, é usada para tratar diabetes tipo 2. Esse fármaco liga-se ao canal de $K^+$ controlado por ATP e fecha-o, o que é mostrado nas Figuras 23-27 e 23-28.

(a) Considerando o mecanismo mostrado na Figura 23-27, o tratamento com gliburida resultaria em aumento ou diminuição da secreção de insulina pelas células $\beta$ pancreáticas? Explique seu raciocínio.

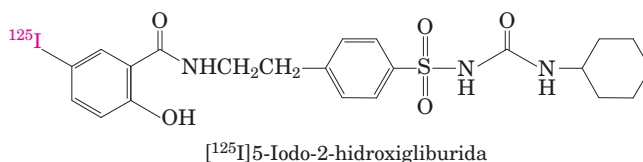
(b) Como o tratamento com gliburida ajudaria a reduzir os sintomas do diabetes tipo 2?

(c) Você esperaria que a gliburida fosse útil para tratar o diabetes tipo 1? Por quê? Ou por que não?

Aguilar-Bryan e colaboradores (1995) clonaram o gene para a subunidade receptora da sulfonilureia (SUR) do canal de $K^+$ controlado por ATP de hamsters. A equipe de pesquisa foi extremamente rigorosa ao assegurar que o gene clonado era de fato o gene que codificava a SUR. Aqui consideramos como é possível para os pesquisadores demonstrarem que clonaram na verdade o gene de interesse e não outro gene.

O primeiro passo foi obter a proteína SUR pura. Como já se sabia, fármacos do tipo da gliburida ligam SUR com alta afinidade ($K_d$ < 10 nM), e a SUR tem uma massa molecular de 140 a 170 kDa. Aguilar-Bryan e colaboradores utilizaram essa ligação de alta afinidade da gliburida para "etiquetar" a proteína SUR com marca radioativa, que serviria como marcador na purificação da proteína a partir de um extrato celular. Inicialmente, produziram um derivado radioativo da gliburida, utilizando iodo radioativo ($^{125}I$):

$^{125}I$ O NHCH$_2$CH$_2$ OH O S O N H O N H

$[^{125}I]$5-Iodo-2-hidroxigliburida

(d) Em estudos preliminares, o derivado da gliburida marcado com $^{125}I$ (doravante $[^{125}I]$gliburida) mostrou ter o mesmo $K_d$ e as mesmas características de ligação que a gliburida original. Por que era necessário fazer essa demonstração? (Quais possibilidades alternativas essa observação eliminou?)

Embora a $[^{125}I]$gliburida ligue SUR com alta afinidade, uma quantidade significativa do fármaco marcado se dissociaria da proteína SUR durante a purificação. Para prevenir tal dissociação, a $[^{125}I]$gliburida deveria estabelecer ligações cruzadas covalentes com a SUR. Há muitos métodos para se estabelecer tais ligações, e Aguilar-Bryan e colaboradores utilizaram luz UV. Quando moléculas aromáticas são expostas a luz UV de

ondas curtas, entram em um estado excitado e facilmente formam ligações covalentes com moléculas próximas. Por meio de ligações cruzadas entre a proteína SUR e a gliburida marcada radioativamente, os pesquisadores simplesmente acompanhavam a radioatividade do $^{125}I$ para seguir a SUR ao longo do procedimento de purificação.

Aguilar-Bryan e colaboradores trataram células HIT (que expressam SUR) de hamsters com [$^{125}I$]gliburida e luz UV, purificaram a proteína de 140 kDa marcada com $^{125}I$ e sequenciaram os 25 resíduos de aminoácidos de seu segmento aminoterminal; encontraram a sequência PLAFCGTENHSAAYRVDQGVLNNGC. Os investigadores produziram então anticorpos específicos para dois peptídeos curtos dessa sequência, um para a sequência PLAFCGTE e outro para a sequência HSAAYRVDQGV, e mostraram que esses anticorpos ligavam-se à proteína purificada de 140 kDa marcada com $^{125}I$.

(e) Por que foi necessário incluir essa etapa com ligação por anticorpos?

A seguir, os pesquisadores construíram segmentos iniciadores para PCR com base nas sequências acima, e clonaram um gene de uma biblioteca de DNA complementar de hamster que codificava uma proteína, a qual incluía essas sequências (ver Capítulo 9, sobre métodos em biotecnologia). O pressuposto cDNA de *SUR* clonado hibridizava com um mRNA de tamanho apropriado, presente em células que certamente continham SUR. O suposto cDNA para *SUR* não hibridizava com qualquer fração de mRNA isolado de hepatócitos, que não expressam SUR.

(f) Por que foi necessário incluir essa etapa de hibridização entre o suposto cDNA para *SUR* e mRNA?

Por fim, o gene clonado foi inserido e expressado em células COS, as quais normalmente não expressam o gene *SUR*. Os investigadores trataram essas células com [$^{125}I$]gliburida, com ou sem um grande excesso de gliburida não marcada, expuseram as células à luz UV e mediram a radioatividade na proteína de 140 kDa produzida. Seus resultados são mostrados na tabela.

| Experimento | Tipo celular | Suposto cDNA para *SUR* adicionado? | Excesso de gliburida não marcado adicionado? | Marcação com $^{125}I$ em proteína de 140 kDa |
|---|---|---|---|---|
| 1 | HIT | Não | Não | +++ |
| 2 | HIT | Não | Sim | – |
| 3 | COS | Não | Não | – |
| 4 | COS | Sim | Não | +++ |
| 5 | COS | Sim | Sim | – |

(g) Por que no experimento 2 não foi observada proteína de 140 kDa marcada com $^{125}I$?

(h) Como você usaria a informação da tabela para argumentar que o cDNA codificava SUR?

(i) Que outra informação você precisa obter para estar mais confiante de que clonou o gene *SUR*?

## Referência

**Aguilar-Bryan, L., Nichols, C.G., Wechsler, S.W., Clement, J.P. IV, Boyd, A.E. III, González, G., Herrera-Sosa, H., Nguy, K., Bryan, J. & Nelson, D.A.** (1995) Cloning of the β cell high-affinity sulfonyl-urea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* **268**, 423-426.

# PARTE III

# Vias da Informação



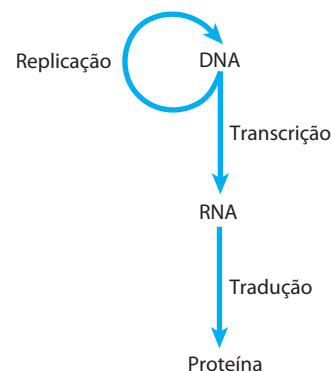
A terceira e última parte deste livro investiga os mecanismos bioquímicos subjacentes a necessidades aparentemente contraditórias para a continuidade genética e a evolução dos organismos vivos. Qual é a natureza molecular do material genético? Como a informação genética é transmitida de uma geração para a próxima com grande fidelidade? De que modo as raras alterações, que são a matéria-prima da evolução, surgem no material genético? Como a informação genética, em última instância, se expressa em sequências de aminoácidos na incrível variedade de moléculas proteicas de uma célula viva?

O conhecimento atual das vias da informação surgiu da convergência da genética, da física e da química na bioquímica moderna. Isto foi sintetizado pela descoberta da estrutura do DNA em dupla-hélice, postulada por James Watson e Francis Crick em 1953 (ver Figura 8-13). A teoria genética contribuiu para o conceito de codificação por genes. A física permitiu a determinação da estrutura molecular pela análise por difração por raios X. A química revelou a composição do DNA. O profundo impacto da hipótese de Watson-Crick surgiu da sua capacidade de explicar uma vasta gama de observações provenientes de estudos nessas diferentes disciplinas.

Isso revolucionou a nossa compreensão da estrutura do DNA e inevitavelmente estimulou questionamentos sobre a sua função. A estrutura em dupla-hélice, por si só, sugeria, com clareza, como o DNA deveria ser copiado, de forma que a informação nele contida pudesse ser transmitida de uma geração à outra. Esclarecimentos sobre como a informação no DNA é transformada em proteínas funcionais vieram com a descoberta do RNA mensageiro e do RNA transportador e com a decifração do código genético.

Esses e outros grandes avanços deram origem ao dogma central da biologia molecular, abrangendo os três maiores processos na utilização celular da informação genética. O primeiro é a replicação, a cópia do DNA parental para formar moléculas-filhas de DNA com sequências nucleotídicas idênticas. O segundo é a transcrição, o processo pelo qual partes da mensagem genética codificada pelo DNA são precisamente copiadas em RNA. O terceiro é a tradução, por meio do qual a mensagem genética codificada no RNA mensageiro é traduzida nos ribossomos em um polipeptídeo com uma sequência específica de aminoácidos.

A Parte III explora esses e outros processos a eles relacionados. No Capítulo 24, são examinados a estrutura, a topologia e o empacotamento de cromossomos e genes. Os processos subjacentes ao dogma central são elaborados nos Capítulos 25 a 27. Por fim, será abordada a regulação, examinando como é controlada a expressão da informação genética (Capítulo 28).

Um tema importante nesses capítulos é a complexidade inerente à biossíntese das macromoléculas que contêm informações. Ácidos nucleicos e proteínas são organizados em sequências específicas de nucleotídeos e aminoácidos,

O dogma central da biologia molecular, mostrando os caminhos gerais do fluxo da informação via replicação, transcrição e tradução. O termo "dogma" é uma designação incorreta, mantido apenas por razões históricas. Introduzido por Francis Crick em uma época em que poucas evidências corroboravam essas ideias, o dogma se tornou um princípio bem estabelecido.

e essa montagem representa nada menos do que preservar a expressão fidedigna do molde em que a vida se baseia. É possível supor que a formação das ligações fosfodiéster no DNA, ou das ligações peptídicas nas proteínas, seja uma proeza trivial para as células, considerando o arsenal de ferramentas enzimáticas e químicas descritas na Parte II. Entretanto, a estrutura de regras e padrões estabelecidos na nossa análise das vias metabólicas deve ser bastante aumentada para levar em consideração a informação molecular. Ligações devem ser formadas entre subunidades *específicas* nos biopolímeros informacionais, evitando a ocorrência ou a manutenção de erros na sequência. Isso tem um enorme impacto na termodinâmica, na química e na enzimologia dos processos biossintéticos. A formação de uma ligação peptídica necessita de uma quantidade de energia em torno de 21 kJ/mol de ligação e pode ser catalisada por enzimas relativamente simples. Para sintetizar uma ligação entre dois aminoácidos específicos em um ponto particular no polipeptídeo, no entanto, a célula investe em torno de 125 kJ/mol e usa mais de 200 enzimas, moléculas de RNA e proteínas especializadas. A química envolvida na formação da ligação peptídica não muda devido a essa necessidade, mas processos adicionais são acrescentados à reação básica para assegurar que a ligação peptídica seja formada entre aminoácidos específicos. Informação biológica é cara.

A interação dinâmica entre ácidos nucleicos e proteínas é outro tema central da Parte III. Moléculas de RNA regulatórias e catalíticas estão gradualmente ocupando um lugar mais proeminente no entendimento dessas vias (discutidas nos Capítulos 26 e 27). Entretanto, a maioria dos processos que formam as vias do fluxo de informação celular é catalisada e regulada por proteínas. A compreensão dessas enzimas e de outras proteínas pode ter tanto vantagens práticas como intelectuais, pois elas formam as bases da tecnologia do DNA recombinante (já apresentada no Capítulo 9).

A evolução novamente constitui um tema que paira acima dos outros. Muitos dos processos delineados na Parte III podem ser rastreados bilhões de anos e uns poucos podem ser rastreados até o Último Ancestral Comum Universal (LUCA, de *Last Universal Common Ancestor*). O ribossomo, a maior parte do aparato de tradução, e algumas partes da maquinaria de transcrição são compartilhadas por todos os organismos vivos nesse planeta. A informação genética é um tipo de relógio biológico que pode ajudar na definição de relacionamentos ancestrais entre as espécies. As vias de informação compartilhadas conectam o ser humano a cada uma das outras espécies atualmente vivas na Terra e a todas as espécies que vieram anteriormente. A investigação dessas vias está permitindo que cientistas abram vagarosamente a cortina do primeiro ato – os eventos que devem ter anunciado o início da vida na Terra.

# 24

# Genes e Cromossomos



O tamanho das moléculas de DNA é um enigma biológico interessante. Uma vez que essas moléculas são, em geral, muito maiores do que as células e as partículas virais que as contêm (**Figura 24-1**), como é que elas cabem dentro das células ou dos compactados virais? Para tratar essa questão, é preciso transferir o foco da estrutura secundária do DNA, abordada no Capítulo 8, para o extraordinário grau de organização que envolve o empacotamento terciário do DNA dentro dos **cromossomos** – os repositórios da informação genética. O capítulo começa com uma análise dos elementos que compõem cromossomos celulares e virais e depois considera o tamanho e a organização dos cromossomos. Em seguida, discute a topologia do DNA, descrevendo a torção e a supertorção das moléculas de DNA. Finalmente, considera as interações proteína-DNA que organizam cromossomos em estruturas compactas.

**FIGURA 24-1 Capa proteica do bacteriófago T2 rodeada pela sua molécula de DNA única e linear.** O DNA foi liberado pela lise da partícula do bacteriófago em água destilada, o que permitiu que o DNA se espalhasse pela superfície da água. Uma partícula de bacteriófago T2 intacta é constituída por uma cabeça que se afunila em uma cauda com a qual o bacteriófago se fixa à superfície exterior de uma célula bacteriana. Todo o DNA mostrado nessa micrografia eletrônica normalmente está compactado dentro da cabeça do fago.

## 24.1 Elementos cromossômicos

O DNA celular contém genes e regiões intergênicas, e as duas regiões podem servir para desempenhar funções vitais às células. Os genomas mais complexos, como os das células dos eucariotos, necessitam de níveis maiores de organização cromossômica, o que se reflete nas características estruturais dos cromossomos. Primeiro serão considerados os diferentes tipos de sequências de DNA e os elementos estruturais dentro dos cromossomos.

### Os genes são segmentos de DNA que codificam cadeias polipeptídicas e RNA

O conhecimento sobre os genes evoluiu de forma espantosa no último século. Classicamente, um gene foi definido como a porção de um cromossomo que determina ou afeta um único traço ou **fenótipo** (propriedade visível), como a cor do olho. George Beadle e Edward Tatum propuseram uma definição molecular de gene em 1940. Depois de expor esporos do fungo *Neurospora crassa* a raios X e a outros agentes conhecidos por causarem danos ao DNA e alterações em sua sequência (**mutações**), eles detectaram linhagens mutantes de fungos com deficiência em uma ou em outra enzima, algumas vezes resultando em deficiência em uma via metabólica inteira. Beadle e Tatum concluíram que um gene é um segmento de material genético que determina ou codifica uma enzima: a hipótese **um gene-uma enzima**. Depois esse conceito foi ampliado para **um gene-um**

**polipeptídeo**, porque muitos genes codificam proteínas não enzimas ou codificam um polipeptídeo de uma proteína com várias subunidades.

George W. Beadle, 1903-1989

Edward L. Tatum, 1909-1975

A definição bioquímica moderna de gene é ainda mais precisa. Um **gene** é todo o DNA que codifica a sequência primária de algum produto gênico, que pode ser tanto um polipeptídeo quanto um RNA com funções catalíticas ou estruturais. O DNA também contém outros segmentos ou sequências com funções puramente regulatórias. As **sequências regulatórias** fornecem sinais que podem indicar o início ou o fim de um gene, ou influenciar a transcrição de genes, ou funcionar como ponto de início da replicação ou da recombinação (Capítulo 28). Alguns genes podem ser expressos de diferentes maneiras para gerar vários produtos gênicos a partir de um único segmento de DNA. Os mecanismos especializados de transcrição e tradução que permitem esse fenômeno estão descritos nos Capítulos 26 a 28.

Pode-se estimar diretamente o tamanho médio mínimo dos genes que codificam uma proteína. Como está descrito detalhadamente no Capítulo 27, cada um dos aminoácidos de uma cadeia polipeptídica é codificado por uma sequência consecutiva de três nucleotídeos em uma única cadeia de DNA (**Figura 24-2**), e esses "códons" estão organizados em uma sequência que corresponde à sequência de aminoácidos no polipeptídeo codificado por esse gene. Uma cadeia polipeptídica de 350 resíduos de aminoácidos (cadeia de tamanho médio) corresponde a 1.050 pb. Muitos genes de eucariotos e uns poucos em bactérias e arqueias são interrompidos por segmentos de DNA não codificantes e, portanto, são consideravelmente mais longos do que sugere esse cálculo simples.

Quantos genes existem em um único cromossomo? O cromossomo de *Escherichia coli*, um dos genomas de bactéria completamente sequenciado, é uma molécula de DNA circular (no sentido de alça sem extremidades, e não de um círculo perfeito) com 4.639.675 pb. Esses pares de bases codificam cerca de 4.300 genes para proteínas e 157 genes para moléculas de RNA estrutural ou catalítico. Entre os eucariotos, os aproximadamente 3,1 bilhões de pares de bases do genoma humano incluem quase 25.000 genes em 24 cromossomos diferentes.

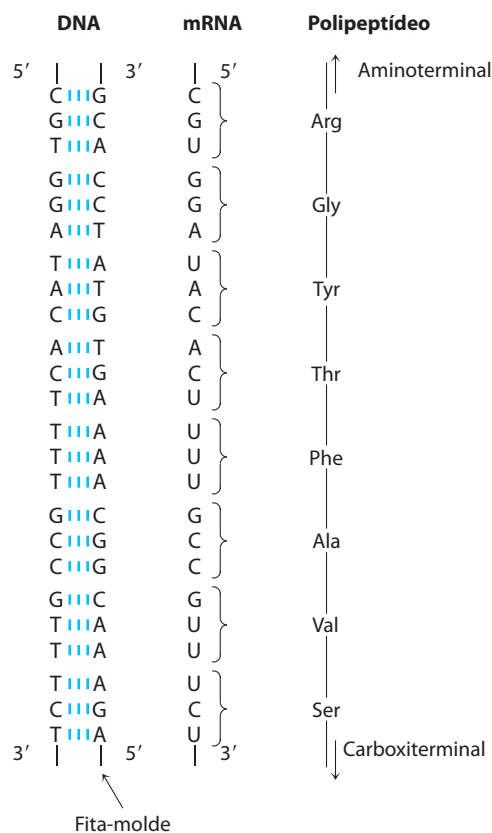



**FIGURA 24-2 Colinearidade entre as sequências de nucleotídeos codificantes do DNA e do mRNA e as sequências de aminoácidos de uma cadeia polipeptídica.** Os tripletes de unidades nucleotídicas no DNA determinam os aminoácidos de uma proteína por meio de um mRNA intermediário. Uma das cadeias de DNA serve como molde para a síntese de mRNA, que têm tripletes de nucleotídeos (códons) complementares aos do DNA. Em alguns genes de bactérias e em muitos genes de eucariotos, as sequências codificantes são interrompidas em intervalos por regiões não codificantes (denominadas íntrons).

## As moléculas de DNA são muito mais longas do que o invólucro celular ou viral que as contém

Geralmente o comprimento do DNA dos cromossomos é várias ordens de magnitude maior do que as células ou os vírus nos quais ele se encontra (Figura 24-1; Tabela 24-1). Isso é verdadeiro para todas as classes de organismos ou de parasitas virais.

**Vírus** Os vírus não são organismos de vida livre. Ao contrário, são parasitas infecciosos que utilizam os recursos da célula hospedeira para desempenhar muitos dos processos de que necessitam para se propagar. Muitas partículas virais são constituídas por não mais do que um genoma (geralmente uma única molécula de RNA ou de DNA) envolto por capa proteica.

Quase todos os vírus de plantas e alguns vírus de bactérias e de animais têm genoma de RNA. Esses genomas tendem a ser especialmente pequenos. Por exemplo, o

**TABELA 24-1** Os tamanhos do DNA e das partículas virais de alguns vírus de bactérias (bacteriófagos)

| Vírus | Tamanho do DNA viral (pb) | Perímetro do DNA viral (nm) | Perímetro da partícula do vírus (nm) |
|---|---|---|---|
| $\phi$X 174 | 5.386 | 1.939 | 25 |
| T7 | 39.936 | 14.377 | 78 |
| $\lambda$ (lambda) | 48.502 | 17.460 | 190 |
| T4 | 168.889 | 60.800 | 210 |

**Nota**: Os dados referentes ao tamanho dos DNA são aqueles da forma replicativa (cadeia dupla). O perímetro foi calculado supondo que cada par de bases ocupa um comprimento de 3,4 Å (ver Figura 8-13).

genoma de retrovírus de mamíferos como o HIV tem um comprimento de cerca de 9.000 nucleotídeos, e o genoma do bacteriófago Q$\beta$ tem 4.220 nucleotídeos. Esses dois tipos de vírus têm genomas de RNA de cadeia simples.

Os genomas de vírus de DNA variam enormemente de tamanho (Tabela 24-1). Muitos DNA virais são circulares em pelo menos parte de seu ciclo de vida. Durante a replicação do vírus dentro de uma célula, tipos específicos de DNA viral, denominados **formas replicativas**, podem aparecer. Por exemplo, muitos DNA lineares se tornam circulares e todos os DNA de cadeia única se tornam de cadeia dupla. Um vírus de DNA de tamanho médio típico é o bacteriófago $\lambda$ (lambda), que infecta *E. coli*. Na sua forma replicativa dentro da célula, o DNA do $\lambda$ é uma dupla-hélice circular. Esse DNA de cadeia dupla contém 48.502 pb e tem um perímetro de 17,5 $\mu$m. O bacteriófago $\phi$X174 é um vírus de DNA muito menor; o DNA da partícula viral é um círculo de cadeia única e a forma replicativa de cadeia dupla contém 5.386 pb. Embora os genomas virais sejam pequenos, o perímetro de seu DNA é geralmente centenas de vezes mais comprido do que as dimensões da partícula viral que os contém (Tabela 24-1).

**Bactérias** Uma única célula de *E. coli* contém quase 100 vezes mais DNA do que uma partícula do bacteriófago $\lambda$. O cromossomo de uma célula de *E. coli* é uma única molécula de DNA circular de cadeia dupla. Seus 4.639.675 pb têm um comprimento de perímetro de cerca de 1,7 mm, aproximadamente 850 vezes o comprimento de uma célula de *E. coli* (**Figura 24-3**). Além do enorme DNA cromossomal circular em seu nucleoide, muitas bactérias têm uma ou mais moléculas de DNA circular pequenas que estão livres no citosol. Esses elementos extracromossômicos são denominados **plasmídeos** (**Figura 24-4**; ver também p. 317). A maioria dos plasmídeos tem comprimento de apenas alguns milhares de pares de bases, mas alguns contêm mais de 10.000 pb. Eles carregam informação genética e sofrem replicação produzindo plasmídeos-filhos, que passam para as células-filhas na divisão celular. Plasmídeos foram encontrados em leveduras e em outros fungos, assim como nas bactérias.

Em muitos casos, os plasmídeos não conferem uma vantagem óbvia a seus hospedeiros e sua única função parece ser a autopropagação. Entretanto, alguns plasmídeos carregam genes que são úteis para a bactéria hospedeira. Por exemplo, alguns genes de plasmídeo tornam a bactéria hospedeira resistente a agentes antibacterianos. Plasmídeos carregando o gene da enzima $\beta$-lactamase conferem resistência aos antibióticos $\beta$-lactâmicos como penicilina, ampicilina e amoxicilina (ver Figura 6-31). Esses e plasmídeos semelhantes podem passar de uma célula resistente ao antibiótico para uma célula sensível ao antibiótico da mesma ou de outra espécie de bactéria, tornando a célula receptora resistente ao antibiótico. O uso abusivo de antibióticos em algumas populações humanas serve como forte pressão seletiva, favorecendo a disseminação de plasmídeos que codificam a resistência a antibióticos (da mesma maneira que os elementos de transposição, descritos a seguir, que carregam genes similares) em bactérias patogênicas. Os médicos têm demonstrado mais relutância em prescrever antibióticos, a menos que fique bem clara a necessidade clínica. Por razões semelhantes, o uso disseminado de antibióticos em rações animais vem sendo restringido.

**Eucariotos** Uma célula de levedura, um dos eucariotos mais simples, tem 2,6 vezes mais DNA no genoma do que uma célula de *E. coli* (Tabela 24-2). As células de *Drosophila*, a mosca-da-fruta utilizada nos estudos genéticos clássicos, contêm mais do que 35 vezes a quantidade de DNA de uma célula de *E. coli*, e as células humanas têm 700 vezes mais. As células de muitas plantas e anfíbios contêm ainda mais. O material genético das células eucarióticas é distribuído nos cromossomos; o número diploide ($2n$) depende da espécie (Tabela 24-2). Uma célula somática humana, por exemplo, tem 46 cromossomos (**Figura 24-5**). Cada cromossomo de uma célula eucariótica, como os mostrados na Figura 24-5a, contém uma única, muito grande, molécula de DNA duplex. As moléculas de DNA dos 24 diferentes tipos de cromossomos humanos (22 pares mais os cromossomos sexuais X e Y) variam de comprimento em mais de 25 vezes. Cada tipo de cromossomo dos eucariotos carrega um conjunto específico de genes.

O DNA do genoma de uma pessoa (22 cromossomos mais um cromossomo X e um Y ou dois cromossomos X), se enfileirado, teria um comprimento de cerca de um metro. A maioria das células humanas é diploide e cada célula contém então um total de 2 metros de DNA. Como o corpo de um homem adulto contém aproximadamente $10^{14}$ células, o seu DNA total tem um comprimento de $2 \times 10^{11}$ km. A comparação desse dado com a circunferência da Terra ($4 \times 10^4$ km) ou a distância entre a Terra e o sol ($1,5 \times 10^8$ km) ilustra o extraordinário grau de compactação do DNA em nossas células.

**FIGURA 24-3** O comprimento de um cromossomo de *E. coli* (1,7 mm) representado na forma linear em relação ao comprimento de uma célula de *E. coli* típica (2 μm).

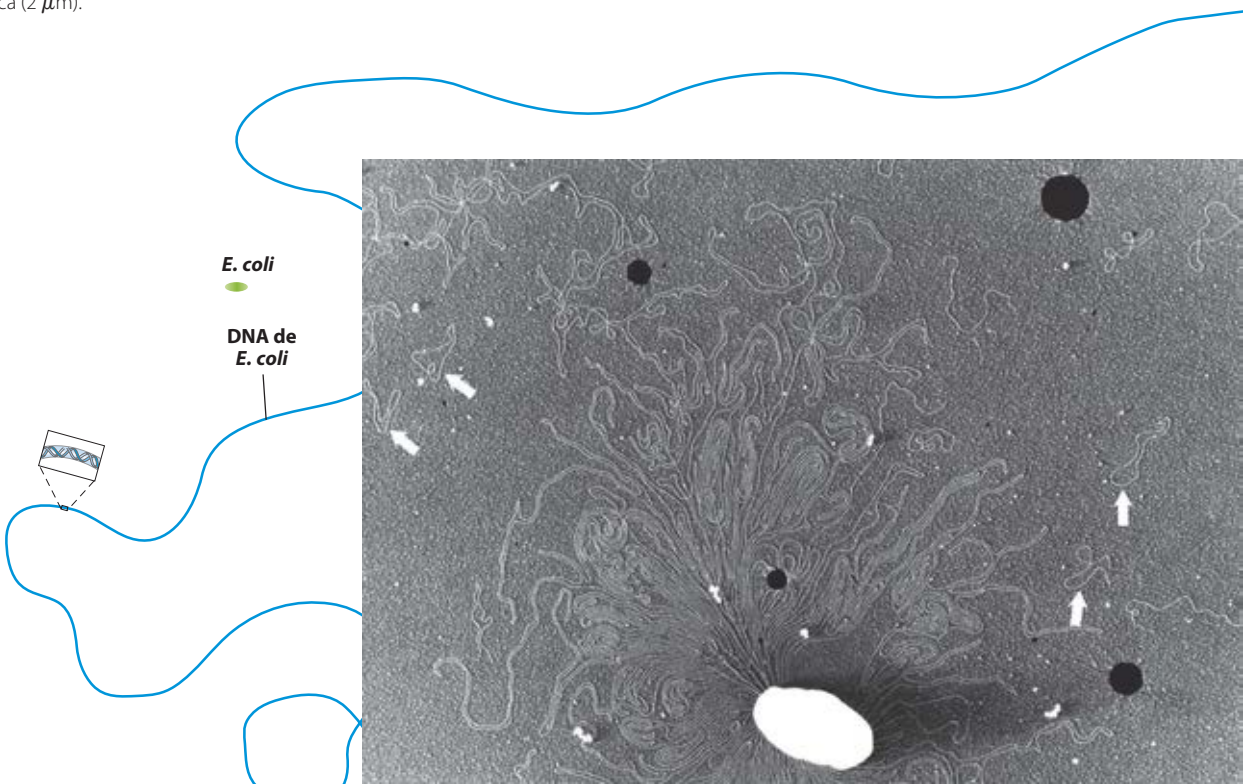
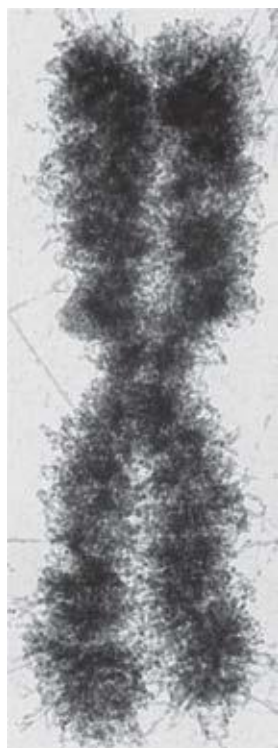



**FIGURA 24-4 DNA de uma célula de *E. coli* lisada.** Nesta micrografia eletrônica, diversos plasmídeos circulares pequenos estão indicados por setas brancas. Os pontos pretos e as manchas brancas são artefatos da preparação.

**TABELA 24-2** Conteúdo de DNA, genes e cromossomos de alguns genomas

| | DNA total (pb) | Número de cromossomos* | Número aproximado de genes |
|---|---|---|---|
| *Escherichia coli* K12 (bactéria) | 4.639.675 | 1 | 4.435 |
| *Saccharomyces cerevisiae* (levedura) | 12.080.000 | 16† | 5.860 |
| *Caenorhabditis elegans* (nematódeo) | 90.269.800 | 12‡ | 23.000 |
| *Arabidopsis thaliana* (planta) | 119.186.200 | 10 | 33.000 |
| *Drosophila melanogaster* (mosca-da-fruta) | 120.367.260 | 18 | 20.000 |
| *Oryza sativa* (arroz) | 480.000.000 | 24 | 57.000 |
| *Mus musculus* (camundongo) | 2.634.266.500 | 40 | 27.000 |
| *Homo sapiens* (humano) | 3.070.128.600 | 46 | 29.000 |

**Nota**: Estas informações são constantemente aprimoradas. Para obter os dados mais recentes, consulte as páginas na Internet de cada projeto individual de genoma.
* O dado corresponde ao número diploide para todos os eucariotos, exceto para a levedura.
† Número haploide de cromossomos. Linhagens selvagens de levedura geralmente têm oito (octaploide) ou mais conjuntos de cromossomos.
‡ Número para fêmeas, com dois cromossomos X. Os machos têm um cromossomo X, mas não têm cromossomo Y, perfazendo um total de 11 cromossomos.

(a)

(b)

**FIGURA 24-5 Cromossomos eucarióticos. (a)** Um par de cromátides-irmãs de um cromossomo humano, associadas e condensadas. Os cromossomos eucarióticos ficam neste estado após a replicação, na metáfase, durante a mitose. **(b)** Conjunto completo de cromossomos de um leucócito de um dos autores deste livro. Existem 46 cromossomos em cada célula somática humana normal.

As células eucarióticas também têm organelas, mitocôndrias (**Figura 24-6**) e cloroplastos que contêm DNA. As moléculas de DNA mitocondrial (mtDNA) são muitos menores do que os cromossomos nucleares. Nas células animais, o mtDNA contém menos do que 20.000 pb (16.569 pb no mtDNA humano) e é um duplex circular. Geralmente, cada mitocôndria tem de 2 a 10 cópias dessa molécula de mtDNA e esse número pode chegar a centenas em certas células de um embrião que esteja em processo de diferenciação celular. Em poucos organismos (p. ex., tripanossomos), cada mitocôndria contém milhares de cópias de mtDNA organizadas em uma matriz complexa e intricada denominada cinetoplasto. O mtDNA de células vegetais mede de 200.000 a 2.500.000 pb. O DNA dos cloroplastos (cpDNA) também existe como duplex circular e seu tamanho varia de 120.000 a 160.000 pb. A origem evolutiva do DNA de mitocôndrias e de cloroplastos é alvo de muita especulação. Uma opinião amplamente aceita afirma que eles são vestígios de cromossomos de bactérias muito primitivas que tiveram acesso ao citoplasma de células hospedeiras e se tornaram precursores dessas organelas (ver Figura 1-38). O DNA mitocondrial codifica os tRNA e rRNA da mitocôndria, além de poucas proteínas mitocondriais. Mais de 95% das proteínas mitocondriais são codificadas pelo DNA nuclear. As mitocôndrias e os cloroplastos se dividem quando a divisão celular ocorre. Os seus DNA são replicados antes e durante a divisão, e as moléculas-filhas de DNA passam para as organelas filhas.

**FIGURA 24-6 Mitocôndria em divisão.** Alguns RNA e proteínas mitocondriais são codificados por uma das cópias do DNA mitocondrial (nenhum é visível na figura). O DNA (mtDNA) é replicado cada vez que a mitocôndria se divide, antes da divisão celular.

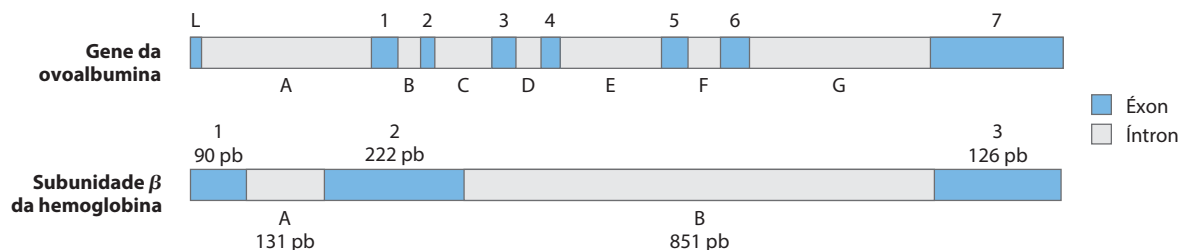



**FIGURA 24-7** **Íntrons em dois genes eucarióticos.** O gene da ovoalbumina tem sete íntrons (de A a G), interrompendo as sequências codificantes em oito éxons (L e de 1 a 7). O gene da subunidade $\beta$ da hemoglobina tem dois íntrons e três éxons, incluindo um íntron que sozinho contém mais da metade dos pares de base do gene.

## Os genes eucarióticos e os cromossomos são muito complexos

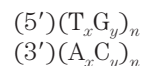
Muitas espécies de bactérias têm apenas um cromossomo por célula, e, em praticamente todos os casos, cada cromossomo contém apenas uma cópia de cada gene. Pouquíssimos genes, como aqueles dos rRNA, estão repetidos várias vezes. Os genes e as sequências regulatórias perfazem quase todo o DNA nas bactérias. Além disso, quase todos os genes são precisamente colineares com as sequências de aminoácidos (ou sequências de RNA) que eles codificam (Figura 24-2).

A organização dos genes no DNA de eucariotos é muito mais complexa estrutural e funcionalmente. O estudo da estrutura dos cromossomos eucarióticos e, mais recentemente, o sequenciamento de genomas inteiros de eucariotos proporcionaram muitas surpresas. Muitos, se não a maioria, dos genes de eucariotos têm uma característica estrutural distinta e enigmática: as sequências de nucleotídeos contêm um ou mais segmentos intercalados de DNA que não codificam a sequência de aminoácidos do produto polipeptídico. Esses insertos não traduzidos interrompem a relação colinear entre a sequência de nucleotídeos do gene e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo que ele codifica. Tais segmentos de DNA não traduzidos nos genes são denominados **sequências intervenientes** ou **íntrons**, e os segmentos codificantes são denominados **éxons**. Poucos genes bacterianos contêm íntrons. Nos eucariotos superiores,um gene típico tem muito mais sequências de íntrons do que sequências de éxons. Por exemplo, no gene que codifica a única cadeia polipeptídica da ovoalbumina, uma proteína do ovo das aves (**Figura 24-7**), os íntrons são muito mais longos do que os éxons. Ao todo, sete íntrons perfazem 85% do DNA do gene. O gene da titina, uma proteína muscular, é o campeão de íntrons, com 178 íntrons. Os genes das histonas parecem não ter íntrons. Na maioria dos casos, a função dos íntrons não é clara. No total, apenas cerca de 1,5% do DNA humano é "codificante" ou éxons do DNA, contendo informação para produtos proteicos. Entretanto, quando os íntrons muito maiores são incluídos no cálculo, até 30% do genoma humano consiste em genes. Uma grande quantidade de trabalho deve ser feita para compreender as outras sequências genômicas. Boa parte do DNA que não faz parte de genes está na forma de sequências repetidas de vários tipos. Esses incluem os elementos de transposição (transposons), parasitas moleculares que constituem aproximadamente a metade do DNA no genoma humano (ver Figura 9-29 e Capítulos 25 e 26).

Aproximadamente 3% do genoma humano é constituído por sequências **altamente repetitivas**, também chamadas de **DNA de sequências simples**, ou **repetições de sequência simples** (**SSR**, de *simple sequence repeats*). Essas sequências curtas, geralmente com comprimento menor do que 10 pb, algumas vezes são repetidas milhões de vezes em cada célula. As repetições de sequência simples também são chamadas de **DNA satélite**, porque a sua composição de bases incomum geralmente as faz migrar como bandas "satélites" (separadas do restante do DNA) quando amostras de DNA celular fragmentado são centrifugadas em gradientes de densidade de cloreto de césio. Estudos sugerem que essas sequências não codificam proteínas nem RNA. Diferentemente dos elementos transponíveis, as sequências de DNA altamente repetitivas podem ter importância funcional identificável no metabolismo celular humano, porque grande parte delas está associada a duas características distintas dos cromossomos eucariotos: centrômeros e telômeros.

O **centrômero** (**Figura 24-8**) é uma sequência de DNA que funciona, durante a divisão celular, como ponto de ancoragem para proteínas que fixam os cromossomos ao fuso mitótico. Essa fixação é essencial para que haja uma distribuição equitativa e ordenada do conjunto de cromossomos para as células-filhas. Os centrômeros de *Saccharomyces cerevisiae* foram isolados e estudados. As sequências essenciais para a função do centrômero têm comprimento de cerca de 130 pb e são muito ricas em pares A═T. As sequências centroméricas dos eucariotos superiores são muito maiores e, ao contrário daquelas da levedura, geralmente contêm DNA de sequência simples, constituído por milhares de cópias em tandem de uma ou de umas poucas sequências curtas de 5 a 10 pb, na mesma orientação. O papel exato do DNA de sequência simples no funcionamento do centrômero ainda não é conhecido.

**Telômeros** (do grego *telos*, "fim") são sequências nos finais dos cromossomos eucariotos que ajudam a estabilizar o cromossomo. Os telômeros terminam por múltiplas sequências repetidas na forma de

$$(5')(T_xG_y)_n$$
$$(3')(A_xC_y)_n$$

onde $x$ e $y$ são geralmente valores entre 1 e 4 (Tabela 24-3). O número de sequências repetidas nos telômeros, $n$, varia de 20 a 100 para a maioria dos eucariotos unicelulares e é geralmente maior do que 1.500 nos mamíferos. As extremidades da molécula linear de DNA não podem ser rotineiramente replicadas pela maquinaria de replicação celular (possível razão para que a molécula de DNA de bactérias

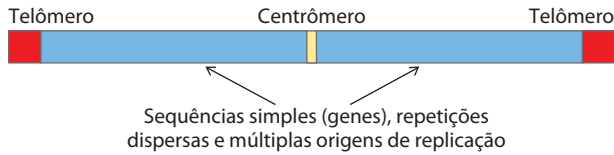



**FIGURA 24-8 Elementos estruturais importantes de um cromossomo de levedura.**

seja circular). As sequências teloméricas repetidas são adicionadas às extremidades dos cromossomos dos eucariotos principalmente pela enzima telomerase (ver Figura 26-38).

Cromossomos artificiais (Capítulo 9) foram construídos a fim de compreender melhor a significância funcional das muitas características estruturais dos cromossomos eucariotos. Um cromossomo artificial linear razoavelmente estável necessita de apenas três componentes: um centrômero, um telômero em cada extremidade e sequências que possibilitem o início da replicação do DNA. Foram desenvolvidos cromossomos artificiais de levedura (YAC, de *yeast artificial chromosome*; ver Figura 9-6) como ferramenta de pesquisa em biotecnologia. De maneira semelhante, estão sendo desenvolvidos cromossomos artificiais humanos (HAC, de *human artificial chromosome*) para o tratamento de doenças genéticas por terapia gênica somática. Estes podem fornecer uma nova maneira para a reposição intracelular de produtos gênicos ausentes ou defeituosos ou terapia gênica somática.

## RESUMO 24.1 Elementos cromossômicos

- Genes são segmentos de um cromossomo que contêm a informação para polipeptídeos funcionais ou moléculas de RNA. Além dos genes, os cromossomos contêm uma variedade de sequências regulatórias envolvidas na replicação, na transcrição e em outros processos.
- Moléculas de DNA genômico e de RNA geralmente têm comprimentos de várias ordens de magnitude maiores do que as partículas virais ou células que as contêm.
- Muitos genes nas células eucarióticas, mas poucos nas bactérias e em arqueias, são interrompidos por sequências não codificantes ou íntrons. Os segmentos codificantes separados por íntrons são denominados éxons.
- Aproximadamente em torno de 1,5% do DNA genômico humano codifica para proteínas. Mesmo quando os íntrons são incluídos, menos de um terço do DNA genômico humano é constituído por genes. Grande parte do restante é constituída por sequências repetidas de vários tipos. Ácidos nucleicos parasitas, conhecidos como transposons, perfazem cerca de metade do genoma humano.
- Os cromossomos eucarióticos têm dois importantes tipos de sequências de DNA repetitivo, com funções especiais: os centrômeros, que são pontos de fixação do fuso mitótico, e os telômeros, localizados nas extremidades dos cromossomos.

**TABELA 24-2** Sequências teloméricas

| Organismo | Sequência repetida no telômero |
|---|---|
| *Homo sapiens* (humano) | $(TTAGGG)_n$ |
| *Tetrahymena thermophila* (protozoário ciliado) | $(TTGGGG)_n$ |
| *Saccharomyces cerevisiae* (levedura) | $((TG)_{1\text{-}3}(TG)_{2\text{-}3})_n$ |
| *Arabidopsis thaliana* (planta) | $(TTTAGGG)_n$ |

## 24.2 DNA supertorcido

O DNA celular, como foi visto anteriormente, é extremamente compactado, o que implica um alto grau de organização estrutural. O mecanismo de enovelamento deve não só compactar o DNA, mas também permitir acesso à informação nele contida. Antes de considerar como isso ocorre nos processos de replicação e transcrição, será examinada uma propriedade importante da estrutura do DNA conhecida como **supertorção**.

"Supertorção" significa enrolar uma espiral. Um fio de telefone, por exemplo, é geralmente uma espiral. O pedaço de fio entre a base do telefone e o fone geralmente inclui uma ou mais supertorções (**Figura 24-9**). O DNA é espiralado na forma de uma dupla-hélice em que cada uma das cadeias do DNA se enrola ao redor de um eixo. O enrolamento do eixo sobre si mesmo (**Figura 24-10**) produz o DNA supertorcido. Como será detalhado a seguir, o DNA supertorcido geralmente é uma manifestação de tensão estrutural. Quando não há curvatura do eixo sobre si mesmo, diz-se que o DNA está no estado **relaxado**.

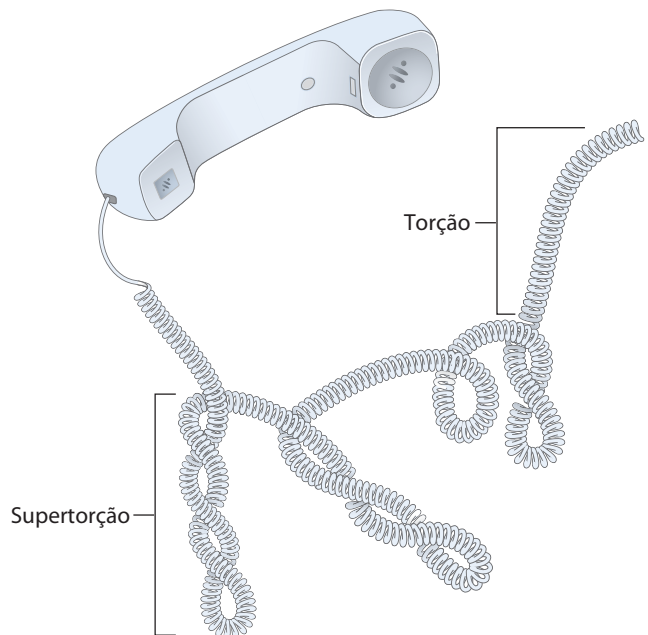



**FIGURA 24-9 Supertorção.** Um fio de telefone comum é torcido como a hélice de DNA, e a corda espiralada pode estar torcida em uma supertorção. A ilustração é especialmente apropriada porque a observação de um fio de telefone ajudou Jerome Vinograd e seus colaboradores a ter a ideia de que muitas das propriedades de pequenos DNA circulares poderiam ser explicadas pela supertorção. A primeira detecção de DNA supertorcido por esses pesquisadores, em pequenos DNA circulares virais, ocorreu em 1965.

**FIGURA 24-10 DNA supertorcido.** Quando o eixo de um DNA de dupla-hélice se enrola sobre si mesmo, ele forma uma nova hélice (super-hélice). A super-hélice de DNA normalmente é denominada supertorcida.

Seria possível prever que a compactação do DNA envolve alguma forma de supertorção. Talvez seja menos previsível o fato de que tanto a replicação quanto a transcrição do DNA também afetam e são afetadas pela supertorção. Ambos os processos necessitam que as duas cadeias do DNA se separem, um processo complicado pelo entrelaçamento das cadeias (como mostrado na **Figura 24-11**).

O fato de que a molécula de DNA consiga se dobrar sobre si mesma e tornar-se supertorcida em um DNA celular altamente compactado pareceria lógico, e talvez trivial, não fosse um fator adicional: muitas moléculas de DNA circulares permanecem altamente supertorcidas mesmo depois de serem extraídas e purificadas, portanto, isentas de proteínas e de outros componentes celulares. Isso indica que a supertorção é uma propriedade intrínseca da estrutura terciária do DNA. Ela ocorre em todos os DNA celulares e é altamente regulada em cada célula.

Várias propriedades mensuráveis da supertorção do DNA foram determinadas e o estudo da supertorção forneceu indícios para a compreensão da estrutura e da função do DNA. Esse trabalho se baseou fundamentalmente em conceitos vindos de um ramo da matemática denominado **topologia**, isto é, o estudo das propriedades de um objeto que não se modifica sob contínua deformação. Para o DNA, a deformação contínua inclui as mudanças conformacionais devidas ao movimento provocado pela energia térmica ou à interação com proteínas e outras moléculas. A deformação descontínua envolve quebra da cadeia de DNA. No caso de uma molécula de DNA circular, uma das propriedades topológicas é o fato de não ser afetada pelas deformações da cadeia de DNA, desde que não ocorram quebras na cadeia. As propriedades topológicas são alteradas apenas por quebra e religação do arcabouço de uma ou ambas as cadeias de DNA.

A seguir, serão examinadas as propriedades fundamentais e as bases físicas da supertorção.

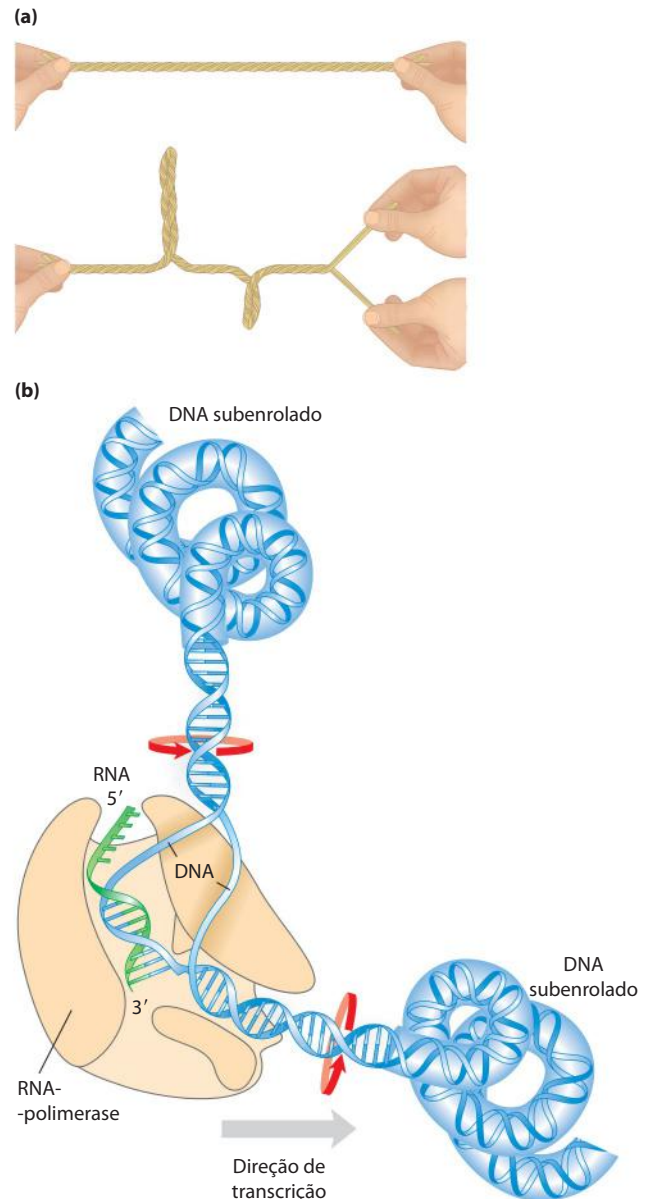



**FIGURA 24-11 Os efeitos da replicação e da transcrição no DNA supertorcido.** A separação das hélices leva ao estresse e à supertorção, pois o DNA está aprisionado (não está livre para girar) antes da separação das cadeias, porque o DNA é uma estrutura de dupla-hélice. **(a)** O efeito geral pode ser ilustrado torcendo duas fitas de borracha uma sobre a outra para formar uma dupla-hélice. Se um lado é aprisionado, a separação das duas fitas na outra extremidade levará a uma torção. **(b)** Na molécula de DNA, o progresso da DNA-polimerase ou da RNA-polimerase (como mostrado aqui) ao longo do DNA envolve a separação das hélices. O resultado é que o DNA fica superenrolado na frente da enzima (a montante) e subenrolado atrás dela (a jusante). As setas vermelhas indicam a direção do enrolamento.

## A maior parte do DNA celular se encontra subenrolado

Para entender a supertorção, é preciso primeiro direcionar a atenção para as propriedades de DNA circulares pequenos, como os plasmídeos e os pequenos DNA virais. Quando um DNA desses não tem quebras em nenhuma de suas duas cadeias, ele é denominado **DNA circular fechado**. Se o DNA de uma molécula circular fechada apresenta uma conforma-

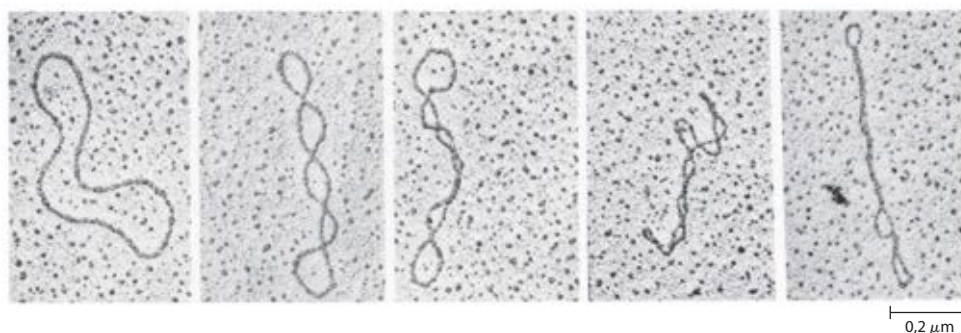



**FIGURA 24-12 DNA de plasmídeos relaxados e supertorcidos.** A molécula na micrografia eletrônica mais à esquerda está relaxada. O grau de supertorção aumenta da esquerda para a direita.

ção próxima da estrutura da forma B (a estrutura de Watson e Crick; ver Figura 8-13), com uma volta da dupla-hélice a cada 10,5 pb, o DNA está relaxado e não supertorcido (**Figura 24-12**). A supertorção ocorre quando o DNA é submetido a alguma forma de tensão estrutural. O DNA circular fechado, quando purificado, raramente está relaxado, independentemente da sua origem biológica. Além disso, DNA derivado de determinado tipo de célula tem um grau característico de supertorção. Portanto, a estrutura do DNA é tensionada de uma maneira regulada pela célula de modo a induzir supertorção.

Em praticamente todos os casos, a tensão é o resultado do **subenrolamento** da dupla-hélice de DNA circular fechado. Em outras palavras, o DNA tem um *número menor* de voltas da hélice do que o esperado para uma estrutura na forma B. Os efeitos desse subenrolamento estão resumidos na **Figura 24-13**. Um segmento de 84 pb de DNA circular no estado relaxado deve conter oito voltas da dupla-hélice, uma a cada 10,5 pb. Se uma dessas voltas é removida, serão 84 pb/7 = 12,0 pb por volta em vez das 10,5 encontradas no B-DNA (Figura 24-13b). Isso é um desvio da forma de DNA mais estável, e, como resultado, a molécula fica termodinamicamente tensionada. Em geral, muito dessa tensão pode ser acomodada pelo enrolamento do eixo do DNA sobre si mesmo, formando uma supertorção (Figura 24-13c; parte da tensão nesse segmento de 84 pb poderia ser simplesmente dispersada na estrutura de uma molécula grande de DNA não enrolada). Em princípio, a tensão pode também ser acomodada pelo afastamento das duas cadeias de DNA a uma distância de cerca de 10 pb (Figura 24-13d). No caso de DNA circular fechado isolado, a tensão introduzida pelo subenrolamento geralmente é acomodada pela supertorção, e não pela separação das cadeias, pois o enrolamento do eixo do DNA geralmente precisa de menos energia do que a quebra das ligações de hidrogênio que estabilizam o pareamento de bases. Observe, entretanto, que o subenrolamento do DNA *in vivo* torna a separação das cadeias mais fácil, facilitando o acesso à informação ali contida.

Cada célula cria ativamente um subenrolamento no seu DNA com o auxílio de processos enzimáticos (descritos a seguir), e o estado tensionado resultante representa uma forma de armazenamento de energia. As células mantêm o DNA em estado subenrolado para facilitar sua compactação por torção. O subenrolamento do DNA também é importante para as enzimas do metabolismo do DNA que devem provocar a separação das cadeias como parte de sua função.

O estado subenrolado pode ser mantido somente se o DNA for um círculo fechado ou se for estabilizado por ligação a proteínas de maneira que as cadeias não estejam livres para girarem uma sobre a outra. Se houver uma quebra em uma das cadeias de um DNA circular isolado e livre de proteínas, a rotação livre nesse ponto espontaneamente reverterá o subenrolamento para o estado relaxado. Em uma molécula de DNA circular fechada, entretanto, o número de voltas da hélice não pode ser alterado sem que ocorra ao menos uma quebra transitória em uma das cadeias. Assim,

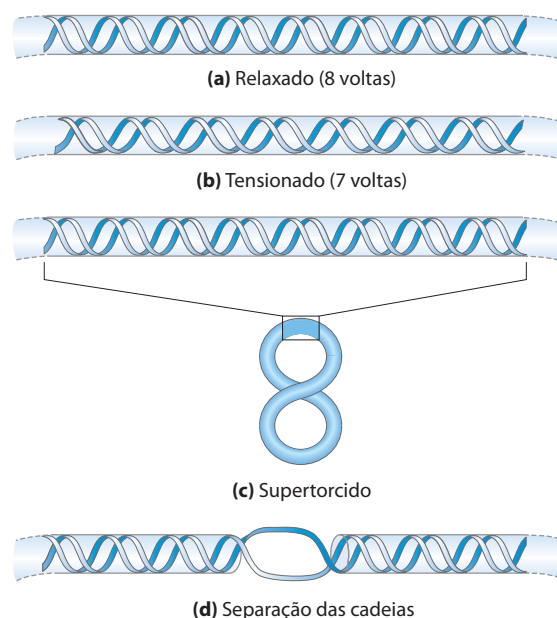



**FIGURA 24-13 Efeitos do subenrolamento do DNA. (a)** Segmento de DNA de molécula circular fechada com comprimento de 84 pb na forma relaxada, com oito voltas na hélice. **(b)** A remoção de uma volta provoca tensão na estrutura. **(c)** A tensão geralmente é acomodada pela formação de uma supertorção. **(d)** O subenrolamento do DNA também facilita a separação das cadeias. Em princípio, cada volta que é desenrolada deve facilitar a separação das cadeias por cerca de 10 pb, como está mostrado na figura. Entretanto, as ligações de hidrogênio entre os pares de bases geralmente impedem a separação das cadeias de DNA em distâncias curtas como essa e o efeito se torna importante apenas no caso de DNA mais longos e com maiores níveis de subenrolamento.

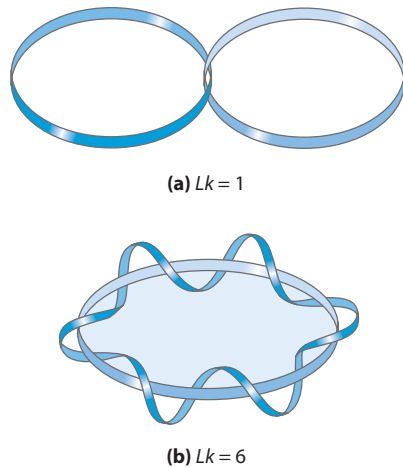



**FIGURA 24-14 Número de ligação, *Lk*.** Nesta figura, como de costume, cada linha azul representa uma cadeia de uma molécula de DNA de fita dupla. Na molécula em **(a)**, $Lk = 1$, e na molécula em **(b)**, $Lk = 6$. Uma das cadeias em (b) está representada não torcida para fins de ilustração e define os limites de uma superfície imaginária (sombreada em azul). O número de vezes que a cadeia representada enrolada passa por essa superfície fornece a definição exata de número de ligação.

**FIGURA 24-15 Número de ligação aplicado a moléculas de DNA circular fechado.** Representação de um DNA circular com 2.100 pb em três formas distintas: **(a)** relaxado, $Lk = 200$; **(b)** relaxado com um corte (quebra) em uma das cadeias, *Lk* indefinido; **(c)** subenrolado em duas voltas, $Lk = 198$. A molécula subenrolada geralmente existe como molécula supertorcida, mas o subenrolamento também facilita a separação das fitas do DNA.

o número de voltas da hélice em uma molécula de DNA fornece uma descrição precisa da supertorção.

## O subenrolamento do DNA é definido pelo número de ligação topológico

O campo da topologia fornece algumas ideias úteis para discutir o DNA supertorcido, particularmente o conceito de **número de ligação**. O número de ligação é uma propriedade topológica de DNA de cadeia dupla porque ele não varia quando o DNA é dobrado ou deformado, desde que ambas as cadeias de DNA permaneçam intactas. O número de ligação ($Lk$) está ilustrado na **Figura 24-14**.

Inicialmente será visualizada a separação de duas cadeias de DNA circular de cadeia dupla. Se as duas cadeias estiverem associadas como está mostrado na Figura 24-14a, elas estão efetivamente unidas pelo que pode ser descrito como ligação topológica. Mesmo que todas as ligações de hidrogênio e as interações por empilhamento de bases fossem abolidas de modo que as duas cadeias não tenham contato físico, essa ligação topológica ainda poderia manter as duas cadeias unidas. Observe uma das cadeias circulares pelo contorno de uma superfície (tal como um filme de sabão que ocupa o espaço delimitado por um fio circular antes de você soprar uma bolha de sabão). O número de ligação pode ser definido como o número de vezes que a segunda cadeia atravessa essa superfície. No caso da molécula da Figura 24-14a, $Lk = 1$. Para a molécula na Figura 24-14b, $Lk = 6$. O número de ligação de um DNA circular fechado é sempre um número inteiro. Por convenção, se as conexões entre as duas cadeias de DNA estiverem arranjadas de tal maneira que as cadeias se enrolem em uma hélice voltada para a direita, o número de ligação é positivo (+), e se as duas cadeias se enrolarem em uma hélice voltada para a esquerda, o número de ligação é negativo (−). Números de ligação negativos, para todos os efeitos práticos, não são encontrados no DNA.

Pode-se agora expandir essas ideias para um DNA circular fechado com 2.100 pb (**Figura 24-15a**). Quando a molécula estiver relaxada, o número de ligação é simplesmente o número de pares de bases dividido pelo número de pares de bases por volta, que é próximo de 10,5, neste caso $Lk = 200$. Para uma molécula de DNA circular ter uma propriedade topológica com esse número de ligação, nenhuma das cadeias deve ter quebra. Se houver uma quebra em alguma das cadeias, as cadeias podem, em princípio, se desenrolarem e se separarem completamente. Nesse caso, não há ligação topológica, e $Lk$ é indefinido (Figura 24-15b).

Agora é possível descrever o subenrolamento do DNA em termos de mudança no número de ligação. O número de ligação no DNA relaxado ($Lk_0$) é usado como referência. No caso da molécula mostrada na Figura 24-15a, $Lk_0 = 200$. Caso sejam removidas duas voltas dessa molécula, $Lk = 198$. A mudança pode ser descrita pela equação

$$\Delta Lk = Lk - Lk_0 = 198 - 200 = -2 \qquad (24\text{-}1)$$

Geralmente é conveniente expressar a mudança no número de ligação em termos de uma grandeza que seja independente do comprimento da molécula de DNA. Essa quantidade, denominada **diferença de ligação específica** ($\sigma$) ou **densidade de super-hélice**, é uma medida do número de voltas removidas em relação ao número existente no DNA relaxado:

$$\sigma = \frac{\Delta Lk}{Lk_0} \qquad (24\text{-}2)$$

No exemplo da Figura 24-15c, $\sigma = -0{,}01$, indicando que 1% (2 de 200) das voltas da hélice presentes no DNA (na sua forma B) foi removido. O grau de subenrolamento do DNA celular geralmente fica entre 5 e 7%, isto é, $\sigma = -0{,}05$ a $-0{,}07$.

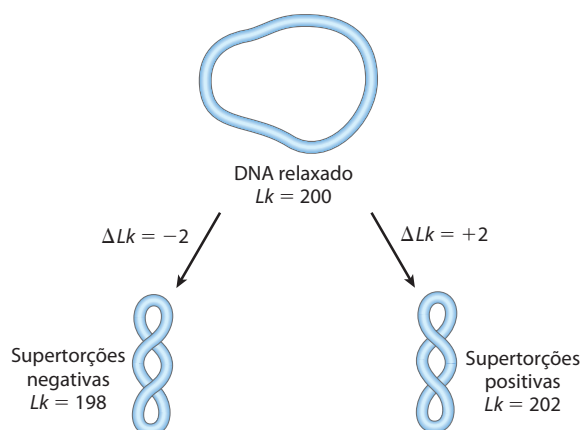



**FIGURA 24-16 Supertorções negativas e positivas.** No caso da molécula de DNA relaxado da Figura 24-15a, o subenrolamento ou superenrolamento por duas voltas da hélice ($Lk = 198$ ou 202) produzirá supertorções negativas ou positivas, respectivamente. Observe que o eixo do DNA se torce em direções opostas em cada caso.

**FIGURA 24-17 Modelo de fita para ilustrar rotação e torção.** A fita cor de bronze representa o eixo de uma molécula de DNA relaxado. A tensão introduzida pelo entrelaçamento das fitas (desenrolando o DNA) pode manifestar-se como torção ou rotação. Geralmente as mudanças topológicas no número de ligação são acompanhadas por alterações geométricas tanto na torção como na rotação.

O sinal negativo indica que a mudança no número de ligação é causada por um subenrolamento no DNA. A supertorção induzida por subenrolamento é, assim, definida como uma supertorção negativa. Do mesmo modo, sob certas condições, o DNA pode ser superenrolado, resultando em uma supertorção positiva. Observe que o lado para o qual o eixo da hélice de DNA gira quando o DNA está subenrolado (supertorção negativa) é a imagem especular do lado para o qual o DNA gira quando está superenrolado (supertorção positiva) (**Figura 24-16**). A supertorção não é um processo aleatório. A via da supertorção é descrita em grande parte pela força que a torção exerce sobre o DNA ao diminuir ou aumentar o número de ligação em relação ao B-DNA.

O número de ligação pode ser mudado por $\pm 1$ pela quebra de uma cadeia de DNA, uma extremidade girando em 360° sobre a cadeia onde não houve quebra de ligação e ligando novamente as extremidades onde houve a quebra da cadeia. Essa mudança não tem efeito sobre o número de pares de bases ou o número de átomos da molécula de DNA circular. Duas formas de DNA circular que diferem apenas em uma propriedade topológica são denominadas **topoisômeros**.

**PROBLEMA RESOLVIDO 24-1 Cálculo da densidade da super-hélice**

Qual é a densidade de super-hélice ($\sigma$) de um DNA circular fechado com comprimento de 4.200 pb e um número de ligação ($Lk$) de 374? Qual é a densidade de super-hélice do mesmo DNA quando $Lk = 412$? Essas moléculas são negativa ou positivamente supertorcidas?

**Solução:** Primeiro, calcule $Lk_0$, dividindo o comprimento do DNA circular fechado (em pb) por 10,5 pb/volta: (4.200 pb)/(10,5 pb/volta) = 400. Pode-se agora calcular $\Delta Lk$ a partir da Equação 24-1: $\Delta Lk = Lk - Lk_0 = 374 - 400 = -26$. Substituindo os valores de $\Delta Lk$ e $Lk_0$ na Equação 24-2: $\sigma = \Delta Lk/Lk_0 = -26/400 = -0{,}065$. Uma vez que essa densidade de super-hélice é negativa, a molécula de DNA é supertorcida negativamente.

Quando a mesma molécula de DNA tem $Lk$ de 412, $\Delta Lk = 412 - 400 = 12$, e $\sigma = 12/400 = 0{,}03$. A densidade de super-hélice é positiva, e a molécula é supertorcida positivamente.

O número de ligação pode ser dissecado em dois componentes estruturais, **rotação** (***Tw,*** de ***twist***) e **torção** (***Wr***, de ***writhe***) (**Figura 24-17**). Esses conceitos são mais difíceis de serem descritos do que o número de ligação, mas a torção pode ser pensada como uma medida do espiralamento do eixo da hélice e a rotação como determinante do local de torção ou relação espacial dos pares de bases vizinhos. Quando o número de ligação é alterado, um pouco da tensão resultante é geralmente compensada pela torção (supertorção) e um pouco por mudança na rotação, originando a seguinte equação

$$Lk = Tw + Wr$$

$Tw$ e $Wr$ não precisam ser números inteiros. Rotação e torção são propriedades geométricas e não propriedades topológicas, porque elas podem ser modificadas por deformações em uma molécula de DNA circular fechada.

Além de causar supertorção e provocar uma separação mais fácil das cadeias, o subenrolamento do DNA facilita alterações estruturais na molécula. Essas alterações têm menor importância fisiológica, mas ajudam a ilustrar os efeitos do subenrolamento. Lembre-se de que uma região cruciforme (ver Figura 8-19) geralmente contém umas poucas bases não pareadas; o subenrolamento do DNA ajuda a manter a separação de cadeias necessária (**Figura 24-18**). O subenrolamento de uma hélice de DNA voltada à direita também facilita a formação de pequenos estiramentos nas regiões de Z-DNA (voltado à esquerda) em regiões onde a sequência de bases seja compatível com a forma Z (ver Capítulo 8).

## As topoisomerases catalisam mudanças no número de ligação do DNA

A supertorção do DNA é um processo regulado com precisão que influencia muitos aspectos do metabolismo do

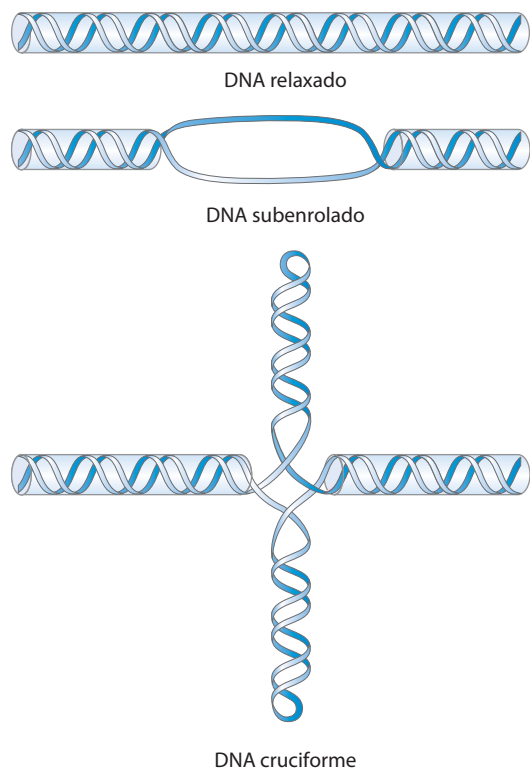



**FIGURA 24-18 Favorecimento de estruturas cruciformes pelo subenrolamento do DNA.** Em princípio, estruturas cruciformes podem formar-se em sequências palindrômicas (ver Figura 8-19), mas raramente ocorrem em DNA na forma relaxada, pois o DNA linear acomoda mais pares de bases em pareamento do que as estruturas cruciformes. O subenrolamento do DNA facilita a separação parcial das cadeias, necessária para propiciar a formação de estruturas cruciformes em sequências apropriadas.

**FIGURA 24-19 Visualização de topoisômeros.** Nesse experimento, todas as moléculas de DNA apresentam o mesmo número de pares de bases, mas exibem variação no grau de supertorção. Uma vez que as moléculas de DNA supertorcidas são mais compactas do que as moléculas relaxadas, elas migram mais rapidamente durante a eletroforese em gel. Os géis aqui mostrados separam topoisômeros (movimento de cima para baixo) que variam pouco na densidade de super-hélice. Na canaleta 1, o DNA altamente supertorcido migra como banda única, mesmo que provavelmente estejam presentes vários topoisômeros. As canaletas 2 e 3 ilustram os efeitos do tratamento de DNA supertorcido com topoisomerase do tipo I. O DNA da canaleta 3 foi tratado por um período de tempo maior do que o DNA da canaleta 2. Como a densidade de super-hélice do DNA fica diminuída até o ponto que corresponda à faixa na qual o gel pode separar topoisômeros individuais, aparecem bandas diferentes. Bandas individuais nas regiões indicadas pelo colchete próximo à canaleta 3 contêm DNA circular com o mesmo número de ligação, e o número de ligação muda em 1 de uma banda para a outra.

DNA. Cada célula tem enzimas cuja única função é desenrolar e/ou relaxar o DNA. As enzimas que aumentam ou diminuem o grau de subenrolamento do DNA são as **topoisomerases**, e a propriedade que elas modificam no DNA é o número de ligação. Essas enzimas desempenham um papel muito importante em processos como a replicação e a compactação do DNA. Existem duas classes de topoisomerases. As **topoisomerases do tipo I** agem quebrando transitoriamente uma das duas cadeias do DNA, passando a cadeia não rompida pela brecha e religando as extremidades quebradas. Elas modificam *Lk* em incrementos de 1. As **topoisomerases do tipo II** quebram ambas as cadeias do DNA e modificam *Lk* em incrementos de 2.

Os efeitos dessas enzimas podem ser demonstrados por meio de eletroforese em géis de agarose (**Figura 24-19**). Uma população de DNA de plasmídeos idênticos com o mesmo número de ligação migra como uma banda discreta durante a eletroforese. Os topoisômeros com valores de *Lk* diferindo em apenas 1 podem ser separados por esse método, de modo que mudanças no número de ligação induzidas por topoisomeraes são facilmente detectáveis.

*E. coli* tem ao menos quatro topoisomerases diferentes (I a IV). As do tipo I (topoisomerases I e III) geralmente relaxam o DNA por remoção de supertorções negativas (aumentando *Lk*). A maneira pela qual as topoisomerases de tipo I bacterianas mudam o número de ligação está ilustrada na **Figura 24-20**. Uma enzima bacteriana do tipo II, denominada topoisomerase II ou DNA-girase, pode introduzir supertorções negativas (diminuir *Lk*). Para isso, ela utiliza a energia do ATP. Para alterar o número de ligação do DNA, as topoisomerases do tipo II clivam as duas cadeias da molécula de DNA e passam outro duplex pela quebra. O grau de supertorção do DNA bacteriano é mantido pela regulação da atividade das topoisomerases I e II.

As células eucarióticas também têm topoisomerases do tipo I e do tipo II. As enzimas do tipo I são as topoisomerases I e III. Nos vertebrados, a única enzima do tipo II tem duas isoformas, denominadas II$\alpha$ e II$\beta$. A maioria das enzimas do tipo II, incluindo a DNA-girase de arqueias, é aparentada, definindo a família denominada tipo IIA. Arqueias também têm uma enzima incomum, a topoisomerase VI, que sozinha define a família do tipo IIB. As topoisomerases do tipo II de eucariotos não conseguem desenrolar o DNA (introduzir supertorções negativas), mas podem relaxar tanto supertorções negativas quanto positivas (**Figura 24-21**).

Como será estudado nos próximos capítulos, as topoisomerases desempenham um papel fundamental em todos os aspectos do metabolismo do DNA. Consequentemente, elas são alvos importantes de fármacos no tratamento de infecções bacterianas e câncer (Quadro 24-1)

## A compactação do DNA necessita de uma forma especial de supertorção

As moléculas de DNA supertorcidas são uniformes sob vários aspectos. As supertorções são voltadas para a direita

Conformação fechada

Conformação aberta

Topoisomerase tipo I

❶ A Tyr do sítio ativo ataca a ligação fosfodiéster de uma das cadeias de DNA, clivando-a e criando uma ligação covalente 5′-fosfotirosil proteína-DNA.

❷ A enzima muda para a conformação aberta.

❸ A cadeia de DNA intacta passa pela quebra na outra cadeia.

❹ Enzima na conformação fechada; o 3′-OH liberado ataca a ligação 5′-fosfotirosil proteína-DNA, ligando novamente a cadeia de DNA que havia sido quebrada.

**MECANISMO – FIGURA 24-20** **A reação da topoisomerase do tipo I.** A topoisomerase I bacteriana aumenta o *Lk* pela quebra de uma cadeia de DNA, passando a cadeia intacta através da quebra, e, em seguida, volta a selar a quebra. O ataque nucleofílico pelo resíduo de Tyr do sítio ativo quebra uma cadeia de DNA. As extremidades estão ligadas por um segundo ataque nucleofílico. Em cada etapa, uma ligação de alta energia substitui a outra.

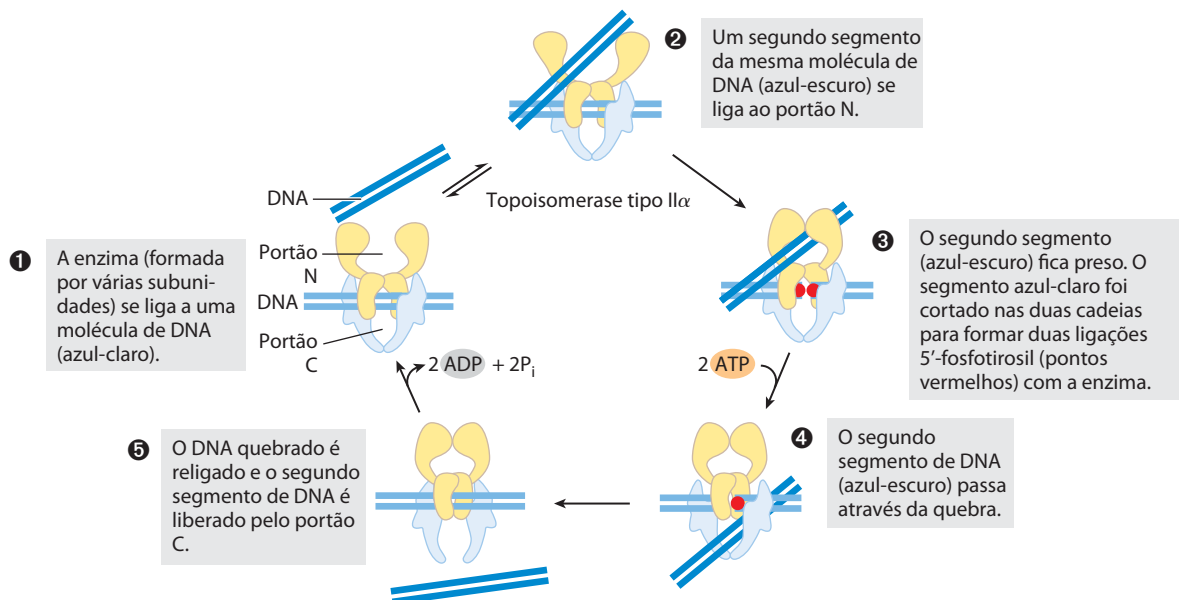



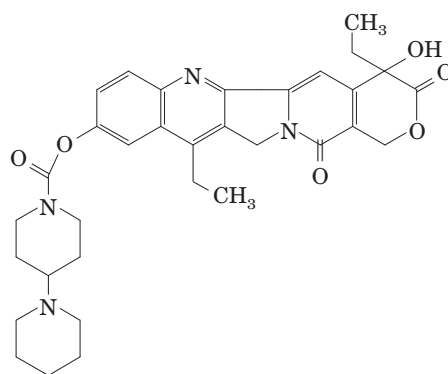
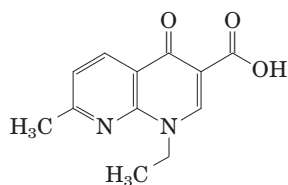
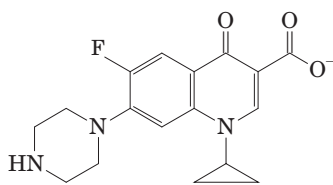
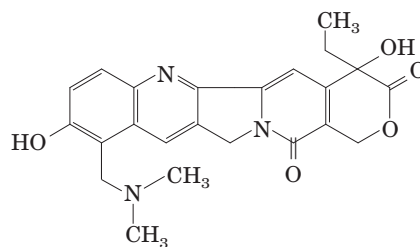
**FIGURA 24-21** **Alteração do número de ligação por topoisomerases do tipo IIα de eucariotos.** O mecanismo geral realça a passagem de um segmento de DNA duplex intacto por meio de uma quebra transitória da cadeia dupla no outro segmento. O segmento de DNA entra e sai da topoisomerase pela cavidade acima e abaixo do DNA ligado, as quais são chamadas de portão N e portão C. Dois ATP são ligados e hidrolisados durante esse ciclo. A estrutura da enzima e o uso do ATP são específicos para essa reação.

## QUADRO 24-1  MEDICINA Curando doenças pela inibição de topoisomerases

O estado topológico do DNA presente nas células está intimamente relacionado com sua função. Sem topoisomerases, as células não podem se replicar, compactar o seu DNA ou expressar seus genes – e morrem. Por conseguinte, os inibidores de topoisomerases se tornaram agentes farmacêuticos importantes direcionados contra agentes infecciosos e células malignas.

Duas classes de inibidores de topoisomerases bacterianas foram desenvolvidas como antibióticos. As cumarinas, incluindo novobiocina e cumermicina A1, são produtos naturais derivados de espécies de *Streptomyces*. Elas inibem a ligação de ATP a topoisomerases do tipo II bacterianas, a DNA-girase e a topoisomerase IV. Esses antibióticos não são usados com frequência para tratar infecções em humanos, mas as pesquisas continuam para identificar variantes que sejam clinicamente efetivas.

Os antibióticos da quinolona, também inibidores da DNA-girase e da topoisomerase IV bacterianas, apareceram inicialmente em 1962 com a introdução do ácido nalidíxico. Esse composto tem eficiência limitada e não é mais usado clinicamente nos Estados Unidos, mas o contínuo desenvolvimento dessa classe de fármaco levou à introdução das fluoroquinolonas, exemplificadas pela ciprofloxacina (Cipro). As quinolonas agem bloqueando a última etapa da reação da topoisomerase, a resselagem da quebra na cadeia de DNA. A ciprofloxacina é um antibiótico de amplo espectro. Ela é um dos poucos antibióticos de efetividade confiável no tratamento de infecções por carbúnculo e é um agente de valor considerável na proteção contra um possível bioterrorismo. As quinolonas são seletivas para as topoisomerases bacterianas, inibindo as enzimas de eucariotos apenas em concentrações várias ordens de grandeza maiores do que as doses terapêuticas.

Alguns dos mais importantes agentes quimioterápicos usados no tratamento do câncer são inibidores de topoisomerases humanas. Geralmente, nas células tumorais, as topoisomerases estão presentes em níveis elevados,

Irinotecano

Ácido nalidíxico

Ciprofloxacina

Topotecano

em uma molécula supertorcida negativamente (Figura 24-16) e tendem a ser estendidas e estreitas em vez de compactadas, geralmente com muitas ramificações (**Figura 24-22**). Nas densidades de super-hélice normalmente encontradas nas células, o comprimento dos eixos supertorcidos, incluindo as ramificações, perfaz cerca de 40% do comprimento total do DNA. Esse tipo de supertorção é denominado **plectonêmica** (do grego *plektos*, "torcido", e

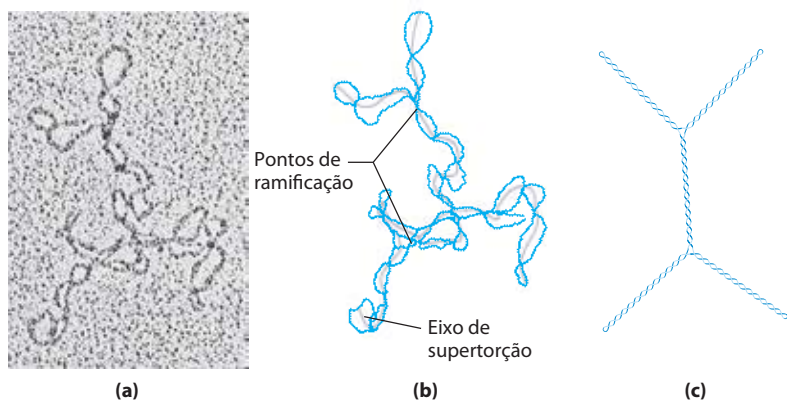



**FIGURA 24-22 Supertorção plectonêmica. (a)** Micrografia eletrônica de um plasmídeo de DNA plectonemicamente supertorcido e **(b)** interpretação da estrutura observada. As linhas de cor púrpura mostram o eixo da supertorção. Observe a ramificação da supertorção. **(c)** Representação idealizada dessa estrutura.

e agentes dirigidos contra essas enzimas são muito mais tóxicos aos tumores do que à maioria dos outros tipos de tecidos. Inibidores das topoisomerases do tipo I e do tipo II foram desenvolvidos como medicamentos anticâncer.

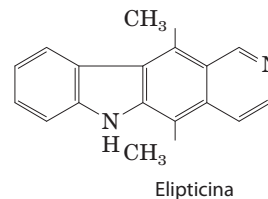
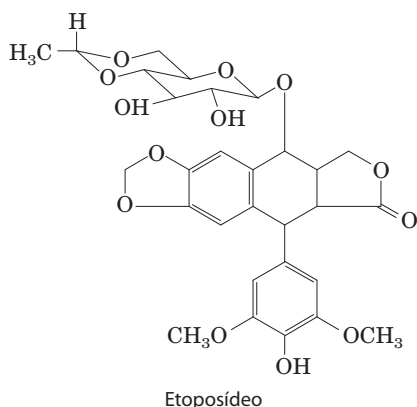
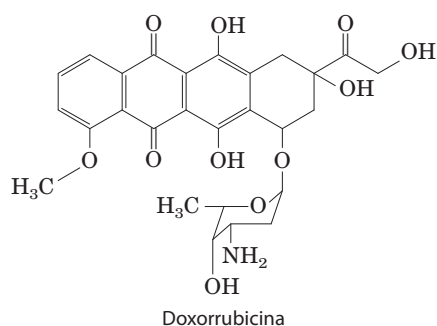
A camptotecina, isolada de uma árvore ornamental chinesa e testada clinicamente pela primeira vez na década de 1970, é um inibidor das topoisomerases do tipo I de eucariotos. Testes clínicos indicaram uma eficácia limitada, apesar dos resultados promissores dos estudos pré-clínicos realizados em camundongos. Entretanto, dois derivados efetivos, o irinotecano (Campto) e o topotecano (Hycamtin), usados respectivamente para o tratamento do câncer colorretal e do câncer de ovário, foram desenvolvidos na década de 1990. É provável que nos próximos anos novos derivados sejam aprovados para uso clínico. Todos esses medicamentos agem fixando o complexo topoisomerase-DNA que clivou o DNA e inibindo a formação de nova ligação.

As topoisomerases do tipo II humanas são alvos de grande número de medicamentos anticâncer, que incluem a doxorrubicina (Adriamicina), etoposídeo (Etopofos) e elipticina. A doxorrubicina, eficaz contra vários tipos de tumores humanos, é uma antraciclina de uso clínico. A maior parte desses medicamentos estabiliza o complexo covalente topoisomerase-DNA (clivado).

Geralmente todos esses agentes anticâncer aumentam os níveis de dano ao DNA nas células tumorais-alvo, que crescem rapidamente. Entretanto, tecidos não cancerígenos também podem ser afetados, levando a uma toxicidade generalizada e a efeitos colaterais indesejáveis que devem ser manejados durante a terapia. À medida que as terapias contra o câncer se tornam mais eficazes e as estatísticas de sobrevivência dos pacientes de câncer melhoram, o aparecimento independente de novos tumores se tornará um grande problema. Na busca contínua de novas terapias contra o câncer, as topoisomerases provavelmente permanecerão como alvo proeminente para pesquisas.

Doxorrubicina

Etoposídeo

Elipticina

*nema*, “filamento”). Esse termo pode ser aplicado a qualquer estrutura com cadeias entrelaçadas de forma simples e regular, e essa é uma boa descrição da estrutura geral do DNA supertorcido quando em solução.

A supertorção plectonêmica, a forma observada em DNA isolados no laboratório, não proporciona compactação suficiente para acomodar o DNA dentro de uma célula. Uma segunda forma de supertorção, a forma **solenoide** (**Figura 24-23**), pode ser adotada por um DNA subenrolado. Em vez de supertorções estendidas com orientação para a direita, características das formas plectonêmicas, a forma supertorcida solenoide envolve voltas apertadas orientadas à esquerda, de maneira semelhante a uma mangueira de jardim cuidadosamente enrolada em um carretel. Embora as suas estruturas sejam completamente diferentes, as supertorções plectonêmicas e solenoides são duas formas de supertorção negativa que podem ser mantidas pelo *mesmo* segmento de DNA subenrolado. As duas formas são facilmente interconversíveis. Embora a forma plectonêmica seja mais estável em solução, a forma solenoide pode ser estabilizada por proteínas ligantes e é a forma encontrada nos cromossomos eucarióticos. Ela proporciona um grau muito maior de compactação (Figura 24-23). A supertorção solenoide é o mecanismo pelo qual o subenrolamento contribui para a compactação do DNA.

## RESUMO 24.2 O DNA supertorcido

- A maioria dos DNA celulares é supertorcida. O subenrolamento diminui o número total de voltas da hélice do DNA, relativamente à forma relaxada (forma B). Para manter um estado subenrolado, o DNA deve estar na forma de círculo fechado ou associado a proteínas. O subenrolamento é medido por um parâmetro topológico denominado número de ligação, *Lk*.
- O subenrolamento é medido em termos de diferença de ligação específica, $\sigma$ (também denominada densidade de super-hélice), que é $(Lk - Lk_0)/Lk_0$. Para DNA celular, $\sigma$ tem valores típicos entre −0,05 a −0,07, o que significa

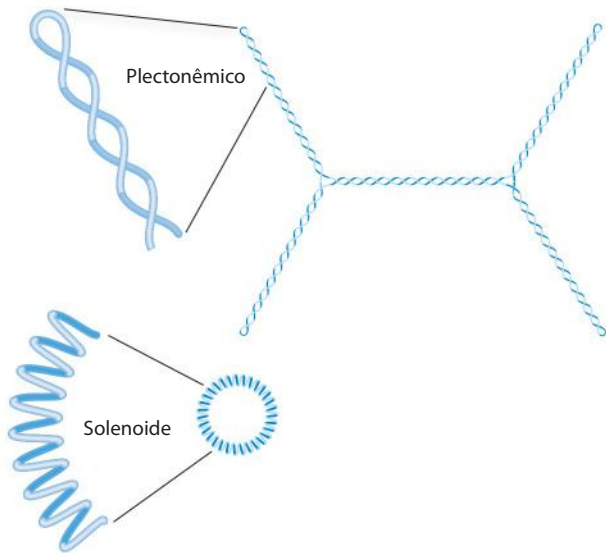



**FIGURA 24-23 Supertorção plectonêmica e supertorção solenoide da mesma molécula de DNA, desenhadas em escala.** A supertorção plectonêmica toma a forma de uma espiral orientada à direita. A supertorção solenoide negativa toma a forma de voltas apertadas orientadas à esquerda ao redor de uma estrutura tubular imaginária. As duas formas são facilmente interconvertidas, embora a forma solenoide em geral não seja observada, a menos que certos tipos de proteínas estejam ligados ao DNA. A supertorção solenoide proporciona um grau muito maior de compactação.

que aproximadamente 5 a 7% das voltas da hélice no DNA foram removidas. O DNA subenrolado facilita a separação das cadeias pelas enzimas do metabolismo do DNA.

- Os DNA que se diferenciam apenas pelo número de ligação são denominados topoisômeros. As enzimas que determinam subenrolamento e/ou relaxam o DNA, as topoisomerases, catalisam mudanças no número de ligação. As duas classes de topoisomerases, tipo I e tipo II, alteram *Lk* em incrementos de 1 e 2, respectivamente, por evento catalítico.

## 24.3 Estrutura dos cromossomos

O termo "cromossomo" é usado para se referir a uma molécula de ácido nucleico que é o repositório da informação genética de um vírus, de uma bactéria, de uma célula eucariótica ou de uma organela. Também se refere a corpos densamente corados observados em núcleos de células eucarióticas coradas, quando visualizadas em microscópio óptico.

### A cromatina é formada por DNA e por proteínas

O ciclo de uma célula eucariótica (ver Figura 12-44) produz mudanças notáveis na estrutura dos cromossomos (**Figura 24-24**). Em células eucarióticas que não estejam se dividindo (em G0) e naquelas em interfase (G1, S e G2), o material cromossômico, a **cromatina**, é amorfo e se mostra aleatoriamente distribuído em certas partes do núcleo. Na fase S da interfase, o DNA nesse estado amorfo se replica, e cada cromossomo produz dois cromossomos-irmãos (denominados cromátides-irmãs) que permanecem associados entre si após o final da replicação. Os cromossomos se tornam muito mais condensados durante a prófase da mitose, tomando a forma do número de pares bem definidos de cromátides-irmãs específico da espécie (Figura 24-5).

A cromatina é constituída por fibras contendo proteína e DNA em proporções aproximadamente iguais (em massa) e ainda uma pequena quantidade de RNA. O DNA na cromatina está associado muito firmemente a proteínas denominadas **histonas**, que empacotam e organizam o DNA em unidades estruturais denominadas **nucleossomos** (**Figura 24-25**). Na cromatina, também são encontradas outras proteínas além das histonas; algumas ajudam a manter a estrutura dos cromossomos e outras regulam a expressão de genes específicos (Capítulo 28). Iniciando pelos nucleossomos, o DNA cromossômico eucariótico é empacotado em sucessivas estruturas altamente organizadas que ao final produzem os cromossomos altamente compactos visualizados na microscopia óptica. Agora será apresentada a des-

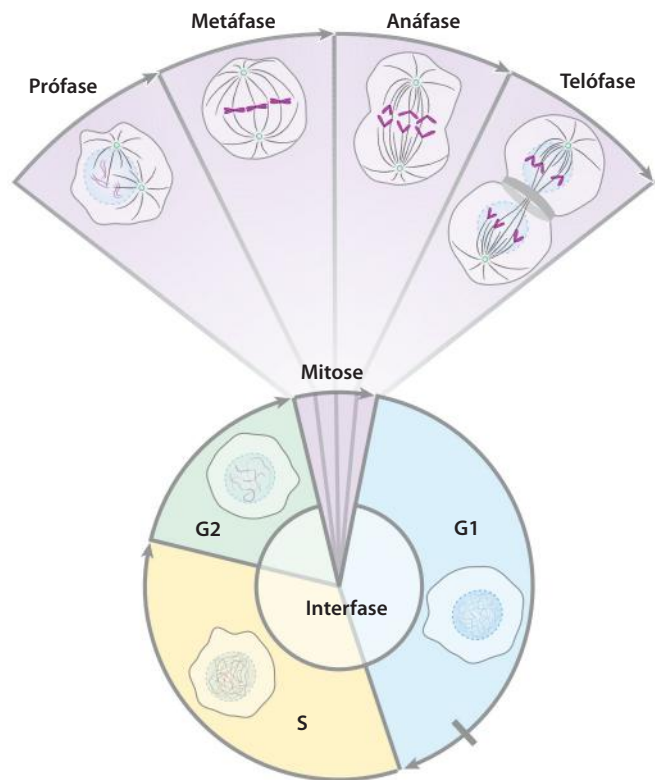



**FIGURA 24-24 Alterações na estrutura dos cromossomos durante o ciclo celular eucariótico.** As durações relativas das fases mostradas aqui foram escolhidas apenas por conveniência. A duração de cada fase varia com o tipo de célula e com as condições de crescimento (para organismos unicelulares) ou com o estado metabólico (para organismos multicelulares); geralmente, a mitose é a fase mais curta. O DNA celular é descondensado durante a interfase, como mostrado nos desenhos dos núcleos do diagrama. O período de interfase pode ser dividido (ver Figura 12-44) em fase G1 (*gap* = intervalo), fase S (síntese), quando o DNA é replicado, e a fase G2, durante a qual os cromossomos replicados (cromátides) unem-se um ao outro. A mitose pode ser dividida em quatro estágios. O DNA sofre condensação na prófase. Durante a metáfase, os cromossomos condensados se alinham em pares ao longo do plano a meio caminho entre os polos do fuso. Os dois cromossomos de cada par são ligados aos diferentes polos do fuso via microtúbulos que se estendem entre o fuso e os centrômeros. As cromátides-irmãs se separam na anáfase, e cada uma é puxada pelo fuso ao polo ao qual se conecta. O processo é terminado na telófase. Depois que a divisão celular está completa, os cromossomos se descondensam, e o ciclo começa novamente.

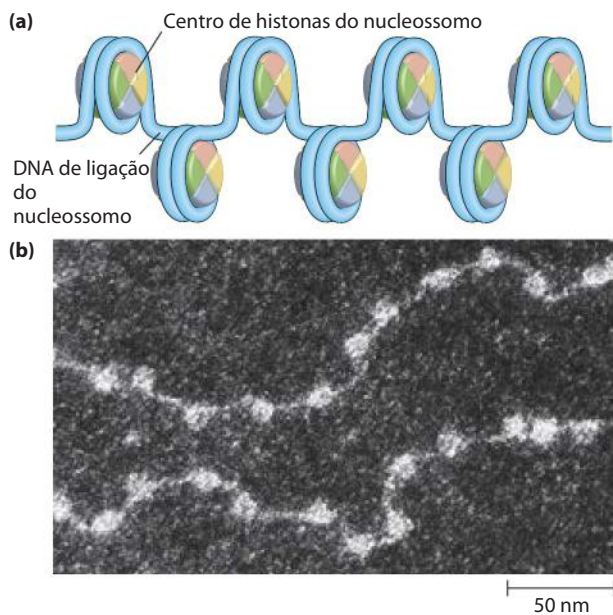



**FIGURA 24-25 Nucleossomos. (a)** Os nucleossomos espaçados regularmente consistem em complexos de histonas associados ao DNA. **(b)** Nessa micrografia eletrônica, as estruturas octaméricas de histonas envoltas por DNA são claramente visíveis.

crição dessa estrutura nos eucariotos, comparando-a com o empacotamento do DNA nas células bacterianas.

## As histonas são proteínas básicas pequenas

Encontradas na cromatina de todas as células eucarióticas, as histonas têm peso molecular entre 11.000 e 21.000 e são muito ricas nos aminoácidos básicos arginina e lisina (em conjunto, esses aminoácidos perfazem um quarto do total de resíduos de aminoácidos). Todas as células eucarióticas têm cinco classes principais de histonas, que diferem no peso molecular e na composição de aminoácidos (Tabela 24-4). As histonas H3 têm sequências de aminoácidos praticamente idênticas em todos os eucariotos, do mesmo modo que as histonas H4, o que sugere uma conservação estrita nas suas funções. Por exemplo, apenas 2 dos 102 resíduos de aminoácidos são diferentes quando comparados às moléculas da histona H4 de ervilha e de bovino, e apenas 8 resíduos diferem entre as histonas H4 de humanos e leveduras. As histonas H1, H2A e H2B apresentam menor similaridade de sequência entre as espécies de eucariotos.

Cada tipo de histona está sujeito a modificações enzimáticas por metilação, acetilação, ADP-ribosilação, fosforilação, glicosilação, sumoilação ou ubiquitinação. Essas modificações afetam a carga elétrica líquida, a forma e outras propriedades das histonas, bem como as propriedades estruturais e funcionais da cromatina, participando na regulação da transcrição.

Além do mais, os eucariotos geralmente têm várias formas variantes de certas histonas, principalmente das histonas H2A e H3, descritas mais detalhadamente a seguir. As formas variantes, juntamente com suas modificações, têm papéis específicos no metabolismo do DNA.

**TABELA 24-4** Tipos e propriedades das histonas comuns

| Histona | Peso molecular | Número de resíduos de aminoácidos | Conteúdo de aminoácidos básicos (% do total) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Lys | Arg |
| H1* | 21.130 | 223 | 29,5 | 11,3 |
| H2A* | 13.960 | 129 | 10,9 | 19,3 |
| H2B* | 13.774 | 125 | 16,0 | 16,4 |
| H3 | 15.273 | 135 | 19,6 | 13,3 |
| H4 | 11.236 | 102 | 10,8 | 13,7 |

* O tamanho dessas histonas varia um pouco de espécie para espécie. Os valores se referem a histonas de bovino.

## Os nucleossomos são as unidades fundamentais da organização da cromatina

Os cromossomos dos eucariotos, esquematizados na Figura 24-5, representam a compactação de uma molécula de DNA com comprimento de cerca de $10^5$ $\mu$m dentro do núcleo da célula que tem diâmetro típico de 5 a 10 $\mu$m. Essa compactação envolve vários níveis de enovelamento altamente organizado. Submeter os cromossomos a tratamentos que os desenovelem parcialmente revela uma estrutura na qual o DNA está firmemente ligado a contas proteicas, geralmente espaçadas regularmente. As contas desse "colar" são complexos de DNA e histonas. Essas contas, juntamente com o DNA que as conecta, formam o nucleossomo, que é a unidade fundamental da organização da cromatina compactada de forma altamente ordenada (**Figura 24-26**). A conta de cada nucleossomo contém oito moléculas de histonas: duas cópias de H2A, duas cópias de H2B, duas cópias de H3 e duas cópias de H4. O espaçamento das contas do nucleossomo forma uma unidade que se repete geralmente a cada 200 pb, dos quais 146 pb estão firmemente ligados ao redor do centro de oito histonas e os restantes servem de DNA de ligação entre as contas do nucleossomo. A histona H1 se liga ao DNA de ligação. O breve tratamento da cromatina com enzimas que digerem DNA leva à degradação preferencial do DNA de ligação, liberando partículas de histonas contendo 146 pb de DNA associado que foram protegidas da digestão. Pesquisadores cristalizaram centros nucleossômicos obtidos dessa maneira, e a análise por difração por raios X mostra uma partícula formada por oito moléculas de histonas com o DNA enrolado na forma de um solenoide supertorcido com orientação voltada para esquerda (Figura 24-26). Estendendo-se a partir do núcleo do nucleossomo estão as causas aminoterminais das histonas, que são intrinsecamente desordenadas (Figura 24-26d). A maioria das modificações nas histomas ocorre nessas caudas que, por sua vez, desempenham um papel-chave na formação de contatos entre nucleossomos na cromatina (Figura 24-26e).

O exame detalhado dessa estrutura mostra por que o DNA dos eucariotos é subenrolado, ainda que as células eucarióticas não tenham enzimas que causem esse subenrolamento. É importante notar que o empacotamento do tipo solenoide do DNA nos nucleossomos é apenas uma das formas de supertorção que pode ocorrer pelo subenrolamento (supertorcido

**FIGURA 24-26 Enrolamento do DNA ao redor do centro de uma histona.** **(a)** A estrutura simplificada de um octâmero do nucleossomo (à esquerda) com DNA enrolado em torno do centro da histona (à direita). **(b)** Uma representação de fita do nucleossomo da rã africana *Xenopus laevis*. Cores diferentes representam as diferentes histonas, correspondendo às cores em (a). **(c)** Representação da superfície do nucleossomo. A vista em (c) está girada em relação à vista em (b) para parear na orientação mostrada acima em (a). Um segmento de DNA de 146 pb na forma de solenoide supertorcida com orientação à esquerda enrolada em torno 1,67 vezes do complexo da histona. **(d)** Duas visões das caudas aminoterminais da histona saindo entre os dois DNA duplex supertorcidos em torno do nucleossomo. Algumas caudas passam entre as supertorções através de buracos formados pelo alinhamento das cavidades menores de hélices adjacentes. As caudas de H3 e H2B surgem entre as duas espirais de DNA enroladas em torno da histona. As caudas de H4 e H2A surgem entre subunidades de histonas adjacentes. **(e)** As caudas aminoterminais de um nucleossomo surgem da partícula e interagem com nucleossomos adjacentes, ajudando a definir uma ordem maior de empacotamento de DNA.

negativamente) do DNA. A forte associação do DNA ao redor do centro de histonas necessita que uma volta da hélice de DNA seja removida. Quando o centro proteico do nucleossomo se associa, *in vitro*, a um DNA circular relaxado, a associação introduz um supertorção negativa. Uma vez que esse processo de associação não cliva o DNA nem muda o número de ligação, a formação de uma supertorção solenoide negativa deve ser compensada por uma supertorção positiva na região do DNA não ligado a histonas (**Figura 24-27**). Como mencionado, as topoisomerases de eucariotos podem relaxar supertorções positivas. O relaxamento da região supertorcida não ligada a histonas deixa a supertorção negativa fixa (por meio da ligação ao centro de histonas do nucleossomo) e leva a uma diminuição total no número de ligação. De fato, foi provado que topoisomerases são necessárias para rearranjar cromatina, *in vitro*, a partir de histonas purificadas e DNA circular.

Outro fator que afeta a ligação do DNA às histonas no centro dos nucleossomos é a sequência desse DNA ligado. Os centros de histonas não ligam DNA aleatoriamente; ao contrário, eles tendem a se posicionar em certas localizações. Esse posicionamento não é compreendido por completo, mas, em certos casos, parece depender de uma abundância de pares de bases A═T na hélice de DNA que fica em contato com as histonas (**Figura 24-28**). O agrupamento de dois ou três pares de base A═T facilita a compreensão da cavidade menor necessária para que o DNA se envolva fortemente em torno do centro de histona do nucleossomo. Os nucleossomos se ligam perfeitamente bem a sequências onde os dinucleotídeos AA ou AT ou TT estejam arranjados alternadamente em intervalos de 10 pb, organização essa que pode corresponder, *in vivo*, a até 50% das posições ligadas a histonas.

Outras proteínas são necessárias para o posicionamento de alguns centros de nucleossomos no DNA. Em vários organismos, certas proteínas se ligam a sequências específicas de DNA, facilitando a formação de nucleossomos nas proximidades. Os nucleossomos são depositados no DNA durante a replicação ou seguindo-se a outros processos que

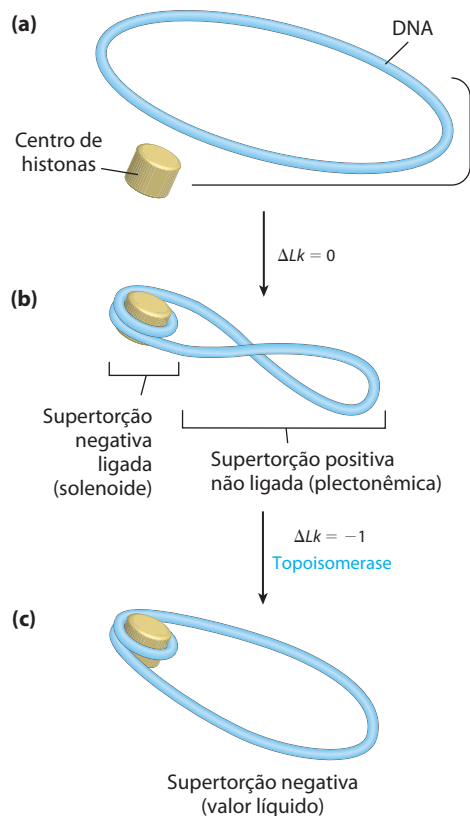



**FIGURA 24-27 Montagem da cromatina. (a)** DNA circular fechado relaxado. **(b)** A ligação ao centro de histonas, que forma o nucleossomo, induz uma supertorção negativa. Na ausência de qualquer quebra no DNA, uma supertorção positiva deve formar-se em outro lugar do DNA ($\Delta Lk = 0$). **(c)** O relaxamento dessa supertorção positiva por uma topoisomerase deixa uma supertorção negativa líquida ($\Delta Lk = -1$).

**FIGURA 24-28 O efeito da sequência do DNA na ligação do nucleossomo.** (PDB ID 1AOI) Períodos de dois ou mais pares de bases A═T facilita a flexão do DNA, enquanto períodos de dois ou mais pares de bases G≡C têm o efeito oposto. Pares de bases A═T consecutivos ajudam na flexão do DNA em um círculo quando eles estão separados por intervalos de em torno de 10 pb. Quando pares de bases G≡C estão separados por 10 pb e deslocados por 5 pb de períodos de pares de base A═T, a ligação do DNA ao cromossomo é facilitada.

necessitam do deslocamento transitório dos nucleossomos. A deposição parece ocorrer em etapas. Um tetrâmero de duas histonas H3 e duas H4 se liga primeiramente, seguido da deposição de dímeros H2A-H2B. A incorporação dos nucleossomos nos cromossomos após a replicação cromossômica é mediada por um complexo de chaperonas de histona que inclui proteínas conhecidas como fator de montagem da cromatina 1 (CAF1, de *chromatin assembly fator 1*), RTT106 (regulação de transposição de *Ty*1) e fator antissilenciador 1 (ASF1, de *anti-silencing fator 1*). Eles se ligam a variantes acetiladas de histonas H3 e H4. O mecanismo da deposição dos nucleossomos ainda não é conhecido em detalhes, embora se saiba que partes desse complexo interajam diretamente com partes da maquinaria de replicação. Algumas das mesmas chaperonas de histonas, ou outras, podem ajudar na montagem de nucleossomos após o reparo de DNA, transcrição ou outros processos. Em certos contextos, fatores de troca de histonas permitem a substituição de histonas variantes no centro de histonas. O posicionamento apropriado dessas variantes de histonas é importante. Estudos têm demonstrado que camundongos sem uma dessas histonas variantes morrem nas primeiras fases de embrião (Quadro 24-2). O posicionamento exato do centro dos nucleossomos também exerce um papel na expressão de certos genes eucarióticos (Capítulo 28).

## Os nucleossomos são condensados em estruturas com níveis de organização sucessivamente maiores

O invólucro do DNA ao redor do centro do nucleossomo compacta o comprimento do DNA em cerca de sete vezes. Entretanto, a compactação final em um cromossomo é maior do que 10.000 vezes – grande evidência da existência de ordens maiores de organização estrutural. Em cromossomos isolados por métodos muito brandos, os centros de nucleossomos parecem estar organizados em uma estrutura denominada **fibra de 30 nm** (**Figura 24-29**). Esse empacotamento inclui uma molécula de histona H1 por centro de nucleossomo. Dois modelos para a organização das histonas e o DNA na fibra de 30 nm estão representados na Figura 24-29. A organização em fibras de 30 nm não se estende por todo o cromossomo, mas é pontuada por regiões ligadas a proteínas (não histonas) que se ligam a regiões de DNA com sequências específicas. A estrutura de 30 nm também parece depender da atividade transcricional de determinada região do DNA. Aparentemente, as regiões nas quais há transcrição de genes estão em estados menos ordenados que apresentam menos, se é que alguma, histona H1.

A fibra de 30 nm, o segundo nível da organização da cromatina, fornece uma compactação do DNA de 100 vezes. Os níveis mais altos de enovelamento ainda não estão com-

## QUADRO 24-2 MÉTODOS Epigenética, estrutura dos nucleossomos e variantes de histonas

A informação passada de uma geração a outra – para as células-filhas na divisão celular ou dos pais para sua prole – não codificada em sequências de DNA, é denominada informação **epigenética**. A maior parte dessa informação está na forma de modificações covalentes das histonas e/ou no posicionamento de variantes de histonas nos cromossomos.

As regiões da cromatina onde está ocorrendo expressão ativa de genes (transcrição) tendem a ser parcialmente descondensadas e são denominadas **eucromatina**. Nessas regiões, as histonas H3 e H2A são muitas vezes substituídas pelas histonas variantes H3.3 e H2AZ, respectivamente (Figura Q-1). Os complexos que depositam nucleossomos contendo variantes de histonas no DNA são semelhantes àqueles que depositam nucleossomos com as histonas mais comuns. Nucleossomos contendo histona H3.3 são depositados por um complexo no qual o fator de montagem da cromatina 1 (CAF1) é substituído pela proteína HIRA (o nome é derivado de uma classe de proteínas denominadas de HIR, *r*epressor de *hi*stonas). Tanto CAF1 quanto HIRA podem ser considerados chaperonas de histonas por ajudarem a assegurar a montagem e o posicionamento apropriados dos nucleossomos. A histona H3.3 se diferencia da H3, quanto à sequência, em apenas quatro resíduos de aminoácidos, mas esses resíduos desempenham um papel-chave na deposição das histonas.

Assim como a histona H3.3, a H2AZ está associada a um complexo diferente de deposição do nucleossomo, estando geralmente associada a regiões da cromatina envolvidas em transcrição ativa. A incorporação de H2AZ estabiliza o octâmero do nucleossomo, mas impede interações cooperativas entre os nucleossomos, necessárias para compactar o cromossomo. Isso leva a uma estrutura mais aberta do cromossomo, o que facilita a expressão de genes na região onde está localizada a histona H2AZ. O gene que codifica H2AZ é essencial nos mamíferos. Na mosca-da-fruta, a perda de H2AZ impede o desenvolvimento além dos estágios larvais.

Outra variante da H2A é a H2AX, que está associada ao reparo do DNA e à recombinação genética. Em camundongos, a ausência de H2AX leva à instabilidade genômica e à infertilidade nos machos. Quantidades modestas de H2AX parecem estar espalhadas ao longo do genoma. Quando ocorre uma quebra em uma fita dupla, moléculas de H2AX da vizinhança são fosforiladas na $Ser^{139}$ da região carboxiterminal. O bloqueio experimental dessa fosforilação inibe a formação dos complexos proteicos necessários para o reparo do DNA.

A variante da histona H3 conhecida como CENPA está associada a sequências repetidas de DNA nos centrômeros. A cromatina da região dos centrômeros contém as chaperonas de histonas CAF1 e HIRA. Essas duas proteínas podem estar envolvidas na deposição dos nucleossomos contendo CENPA. A eliminação do gene da CENPA é letal em camundongos.

A função e a localização de variantes de histonas podem ser estudadas pela aplicação de tecnologias usadas em genômica. Uma técnica útil é a imunoprecipitação de cromatina (cromatina IP, ou ChIP). Nucleossomos contendo determinada histona variante são precipitados por anticorpos que ligam especificamente essa variante. Esses nucleossomos podem ser estudados isolados do seu DNA, mas geralmente o DNA associado está incluído no estudo para determinar onde os nucleossomos de interesse se ligam. O DNA pode ser marcado e usado como sonda em um microarranjo (ver Figura 9-23), para produzir um mapa de sequências genômicas às quais se ligam esses determinados nucleossomos. Uma vez que os microarranjos

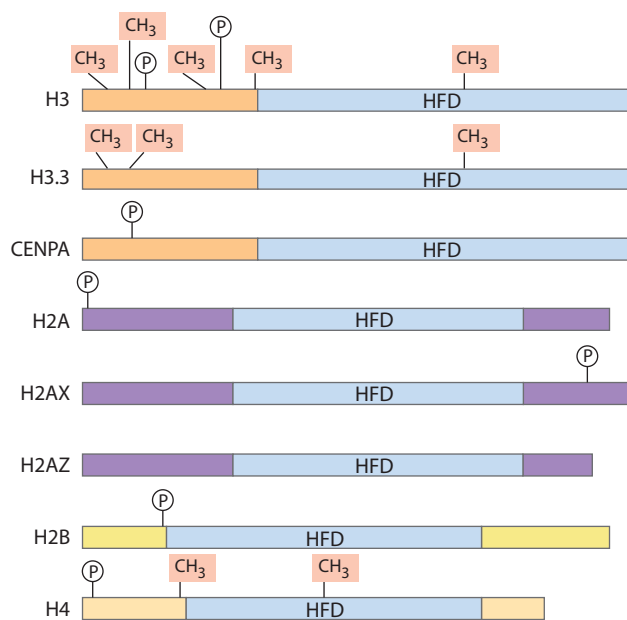



**FIGURA Q-1** Diferentes variantes das histonas H3, H2A e H2B são conhecidas. Aqui estão mostradas as histonas que formam os centros de nucleossomos e algumas variantes conhecidas. Sítios de metilação de resíduos Lys/Arg e de fosforilação de Ser estão indicados. HFD indica um domínio de histona dobrado (do inglês *histone-fold domain*), domínio estrutural comum a todas as histonas do centro do nucleossomo.

preendidos; contudo, parece que certas regiões do DNA se associam com um andaime cromossomal (**Figura 24-30**). As regiões associadas com esse andaime são separadas por alças de DNA com talvez 20 a 100 kpb. O DNA em uma alça de DNA contém um conjunto de genes relacionados entre si. O andaime pode conter várias proteínas, especialmente topoisomerase II e proteínas SMC, descrita acima. A presença da topoisomerase I enfatiza ainda mais a relação entre o DNA subenrolado e a estrutura da cromatina. A topoisomerase II é tão importante para a manutenção da estrutura da cromatina que inibidores dessa enzima podem matar rapidamente as células em divisão. Vários fármacos

são muitas vezes denominados de chips, essa técnica é denominada um experimento ChIP-chip (Figura Q-2).

Histonas variantes, juntamente com as muitas modificações que as histonas podem sofrer, ajudam a definir e isolar as funções da cromatina. Elas marcam a cromatina facilitando ou suprimindo funções específicas, como segregação de cromossomos, transcrição e reparo do DNA. As modificações nas histonas não desaparecem na divisão celular ou durante a meiose e assim são parte da informação transmitida de uma geração para outra em todos os eucariotos.

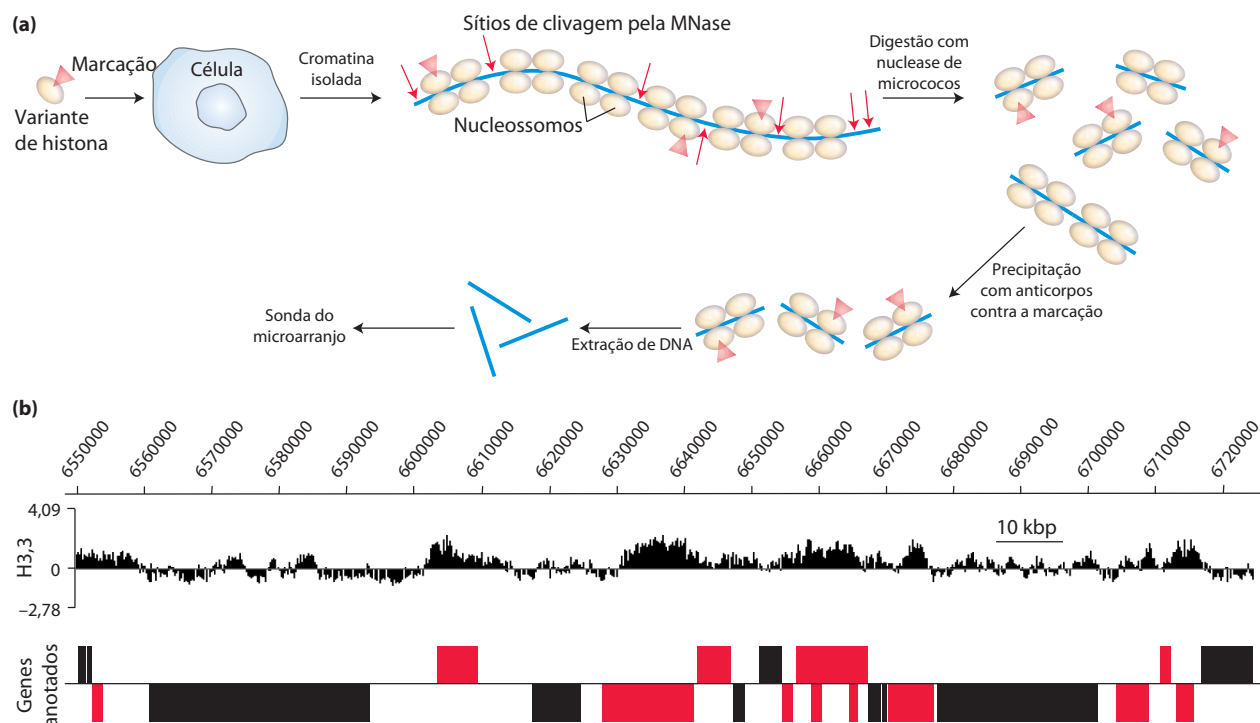



**FIGURA Q-2** Um experimento ChIP-chip foi planejado para mostrar as sequências de DNA genômico às quais se liga uma determinada variante de histona. **(a)** Uma variante de histona contendo uma marca de epítopo (proteína ou estrutura química reconhecida por um anticorpo; ver Capítulos 5 e 9) é introduzida em um tipo de célula, onde será incorporada nos nucleossomos. (Em alguns casos, a marca do epítopo é desnecessária, pois pode haver disponibilidade de anticorpos que se ligam diretamente à modificação da histona de interesse.) A cromatina é isolada de células e digerida brevemente com nuclease de micrococos (MNase). O DNA ligado aos nucleossomos é protegido da digestão, mas o DNA da região de ligação entre os nucleossomos é clivado, liberando segmentos de DNA ligados a um ou dois nucleossomos. O anticorpo é adicionado, e os nucleossomos contendo a variante de histona com o epítopo marcado são precipitados seletivamente. O DNA desses nucleossomos é extraído do precipitado, marcado e usado como sonda em um microarranjo que representa todas ou partes selecionadas das sequências genômicas de um dado tipo de célula. **(b)** Neste exemplo, a ligação da histona H3.3 é descrita em um segmento pequeno do cromossomo 2L *Drosophila melanogaster*. Os números na parte superior correspondem às posições nucleotídicas numeradas no braço do cromossomo. Cada local no microarranjo representa 100 pb de sequência genômica, de forma que os dados representados aqui correspondem a mais de 1.700 locais separados no microarranjo. Em cada local, o sinal do DNA marcado que foi precipitado com o anticorpo para a histona H3.3 está mostrado como proporção do sinal relativo ao sinal controle produzido quando DNA genômico total foi isolado sem imunoprecipitação, foi cortado, marcado com marcações de cores diferentes e usado como sonda no mesmo microarranjo. Os sinais acima da linha horizontal indicam posições genômicas onde a ligação da histona H3.3 está enriquecida em relação ao controle. Os sinais abaixo da linha são regiões onde a histona H3.3 está relativamente ausente. Os genes anotados (conhecidos) presentes nesse segmento do genoma estão mostrados no painel inferior (barras grossas). As barras acima da linha são genes transcritos no sentido 5′ para 3′ da esquerda para a direita, e os quadros abaixo da linha são aqueles transcritos da direita para a esquerda. As barras vermelhas são genes onde a RNA-polimerase II também é abundante, o que indica transcrição ativa. A ligação da histona H3.3 se concentra nos genes e perto deles, sofrendo transcrição ativa.

usados na quimioterapia do câncer são inibidores da topoisomerase II que permitem que a enzima promova a quebra da cadeia, mas não permite a formação de novas ligações no ponto das quebras (ver Quadro 24-1).

Existem evidências da existência de níveis mais altos de organização nos cromossomos dos eucariotos, cada nível aumentando dramaticamente o grau de compactação do cromossomo. A **Figura 24-31** ilustra um dos modelos de como esse grau de compactação é atingido. A estrutura altamente ordenada da cromatina provavelmente varia de cromossomo para cromossomo, de uma região para outra de um mesmo cromossomo e de um momento para outro na

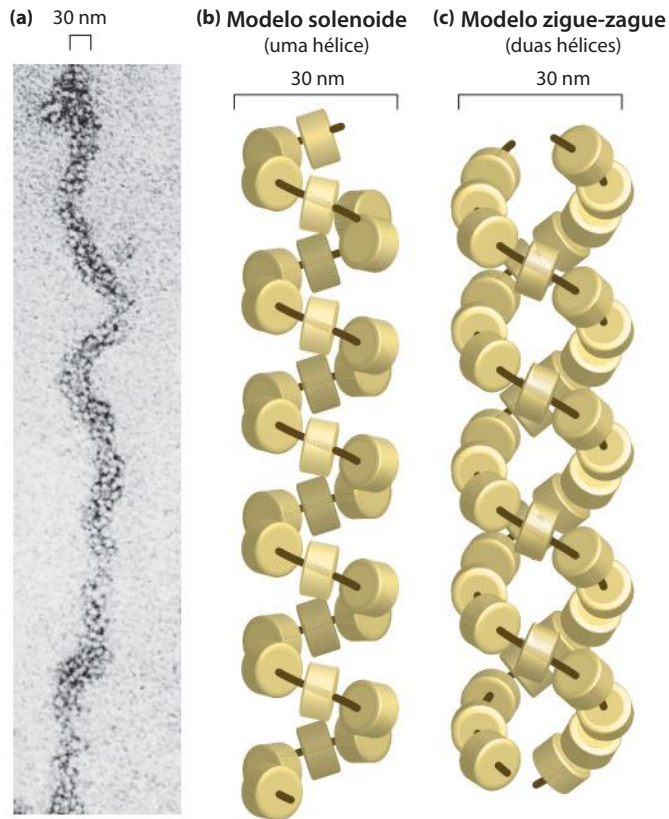



**FIGURA 24-29 A fibra de 30 nm, organização altamente ordenada dos nucleossomos.** A fibra compacta é formada pelo empacotamento firme dos nucleossomos. **(a)** A fibra de 30 nm, como pode ser visualizada por microscopia eletrônica. Existem dois modelos propostos para a estrutura consistentes com os dados disponíveis: **(b)** o modelo solenoide, mostrando um arranjo helicoidal dos nucleossomos e **(c)** o modelo zigue-zague mostrando dois arranjos helicoidais de nucleossomos envoltos um no outro. A linha preta está projetada apenas para delinear o caminho geral proposto da estrutura organizada.

vida da célula. Um único modelo não pode descrever adequadamente essas estruturas. Não obstante, o princípio está claro: a compactação do DNA nos cromossomos dos eucariotos provavelmente envolve torções sobre torções sobre torções... **Empacotamento tridimensional de cromossomos nucleares**.

## As estruturas condensadas dos cromossomos são mantidas pelas proteínas SMC

Uma terceira classe importante de proteínas da cromatina, além das histonas e das topoisomerases, são as **proteínas SMC** (de *structural maintenence of chromosomes*). A estrutura primária das proteínas SMC é formada por cinco domínios distintos (**Figura 24-32a**). Os domínios globulares aminoterminal e carboxiterminal, N e C, que têm, cada um, parte de um sítio de hidrólise de ATP, estão conectados por duas regiões de hélice $\alpha$ como motivo espiral-espiralada (ver Figura 4-11) unido por um domínio de dobradiça. Essas proteínas geralmente são diméricas, formando um complexo em forma de V, que se sabe está ligado por meio dos domínios de dobradiça (Figura 24-32b). Um domínio N e um domínio C se juntam para formar um sítio de hidrólise do ATP completo em cada uma das extremidades do V.

As proteínas da família das SMC são encontradas em todos os tipos de organismo, das bactérias aos seres humanos. Os eucariotos têm dois tipos principais, as coesinas e as condensinas, e ambas estão ligadas a proteínas regulatórias e acessórias (Figura 24-32c). As **coesinas** desempenham um papel substancial na manutenção da união das cromátides-irmãs imediatamente após a replicação e quando os cromossomos se condensam para a metáfase. Essa associação é essencial para que os cromossomos sejam adequadamente segregados na divisão celular. Acredita-se que as coesinas, juntamente com uma terceira proteína, a cleisina, formem um anel ao redor dos cromossomos replicados que os mantém juntos até que a separação seja necessária para a divisão celular. O anel pode expandir-se e contrair em resposta à hidrólise de ATP. As **condensinas** são essenciais para a condensação dos cromossomos quando a célula

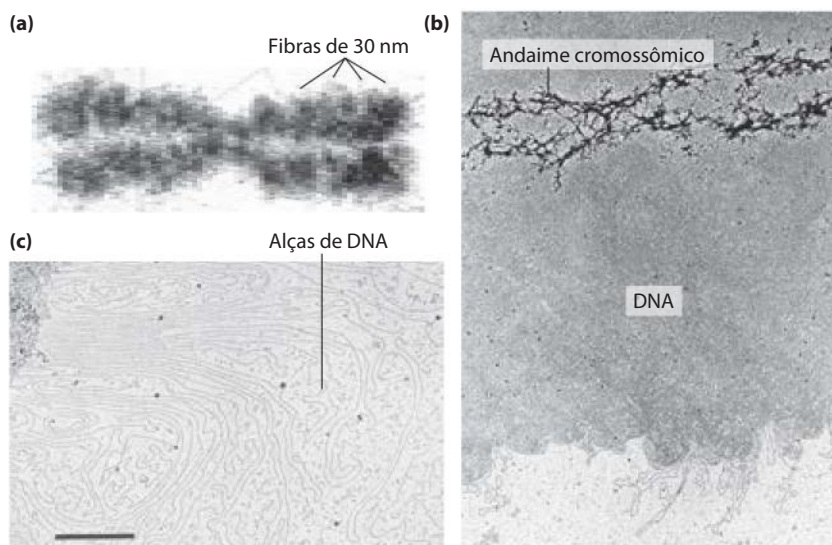



**FIGURA 24-30 As alças de DNA ligadas ao andaime cromossômico.** **(a)** Um cromossomo inchado, produzido em tampão com baixa força iônica, como pode ser visualizado na microscopia eletrônica. Observe a aparência das fibras de 30 nm (alças da cromatina) nas margens. **(b)** A extração das histonas deixa um andaime cromossômico proteico cercado por DNA aberto. **(c)** O DNA parece ser organizado em alças ligadas em sua base ao andaime, no canto superior esquerdo.

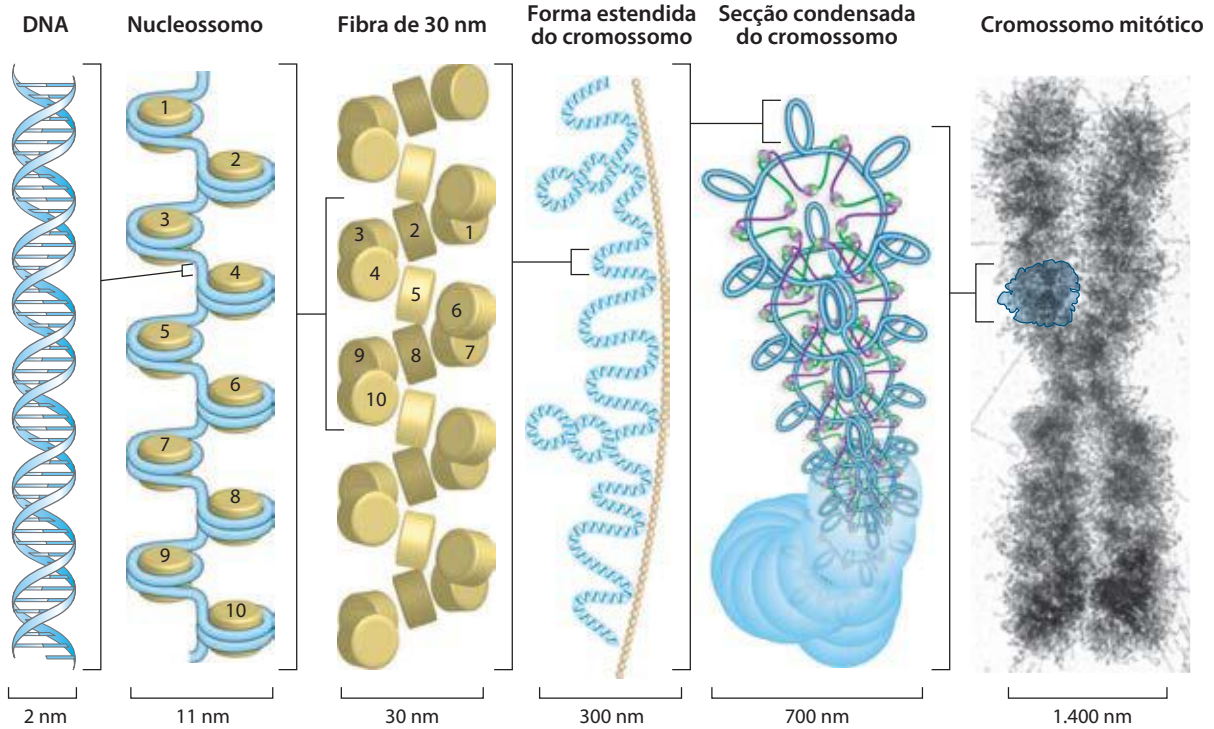



**FIGURA 24-31 Compactação do DNA nos cromossomos eucarióticos.** Esse modelo mostra os níveis de organização compatíveis com o grau de compactação do DNA nos cromossomos de eucariotos. Primeiro o DNA é envolto em octâmeros de histonas, então a histona H1 estimula a formação da fibra de 30 nm. Níveis adicionais de organização não estão completamente esclarecidos, mas parece envolver a formação de espirais adicionais e alças na forma de rosetas, as quais também se espiralam em estruturas mais grossas. De forma geral, níveis graduais de organização assumem a forma de espirais sobre espirais sobre espirais. Nas células, as estruturas de mais alta ordem (acima das fibras de 30 nm) dificilmente são tão uniformes como o apresentado nesse esquema.

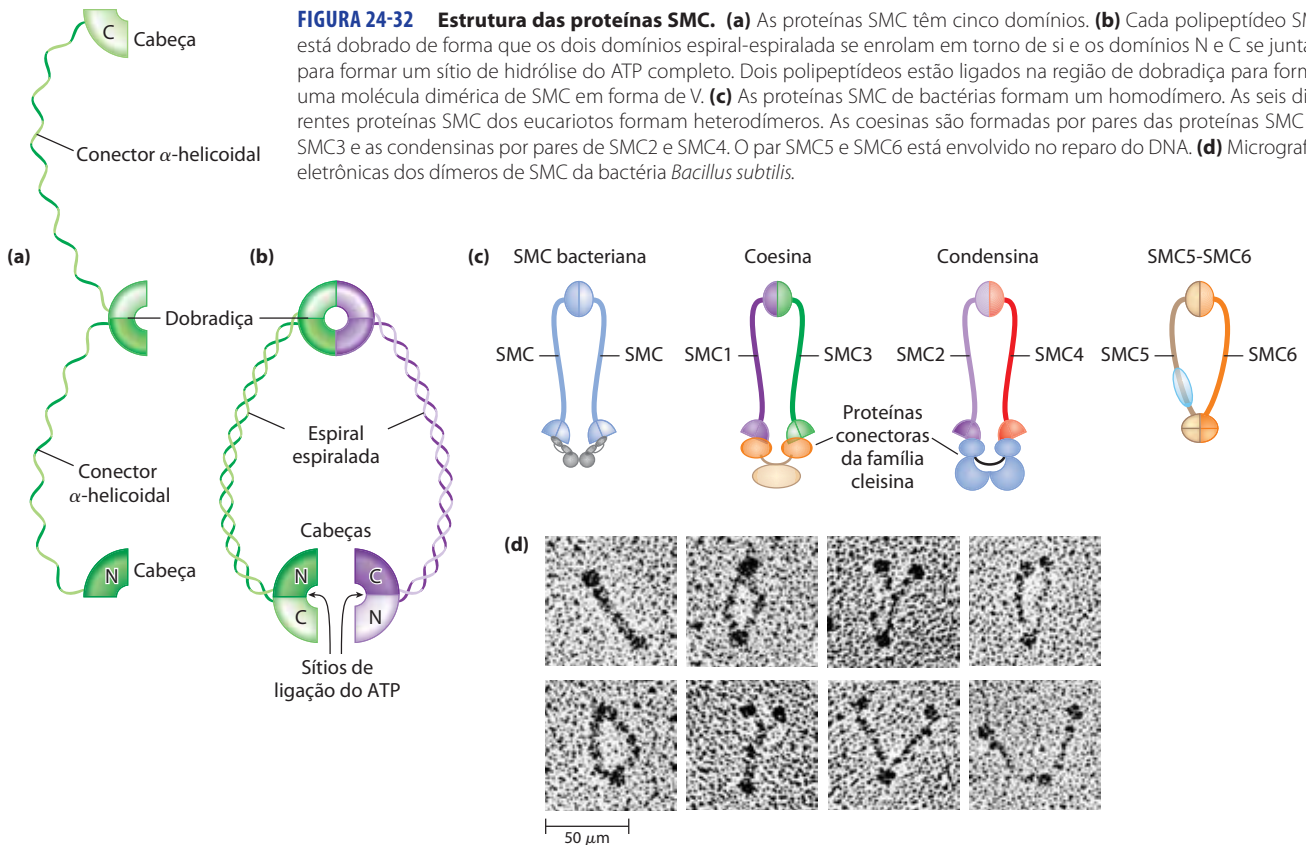



**FIGURA 24-32 Estrutura das proteínas SMC.** **(a)** As proteínas SMC têm cinco domínios. **(b)** Cada polipeptídeo SMC está dobrado de forma que os dois domínios espiral-espiralada se enrolam em torno de si e os domínios N e C se juntam para formar um sítio de hidrólise do ATP completo. Dois polipeptídeos estão ligados na região de dobradiça para formar uma molécula dimérica de SMC em forma de V. **(c)** As proteínas SMC de bactérias formam um homodímero. As seis diferentes proteínas SMC dos eucariotos formam heterodímeros. As coesinas são formadas por pares das proteínas SMC1 e SMC3 e as condensinas por pares de SMC2 e SMC4. O par SMC5 e SMC6 está envolvido no reparo do DNA. **(d)** Micrografias eletrônicas dos dímeros de SMC da bactéria *Bacillus subtilis*.

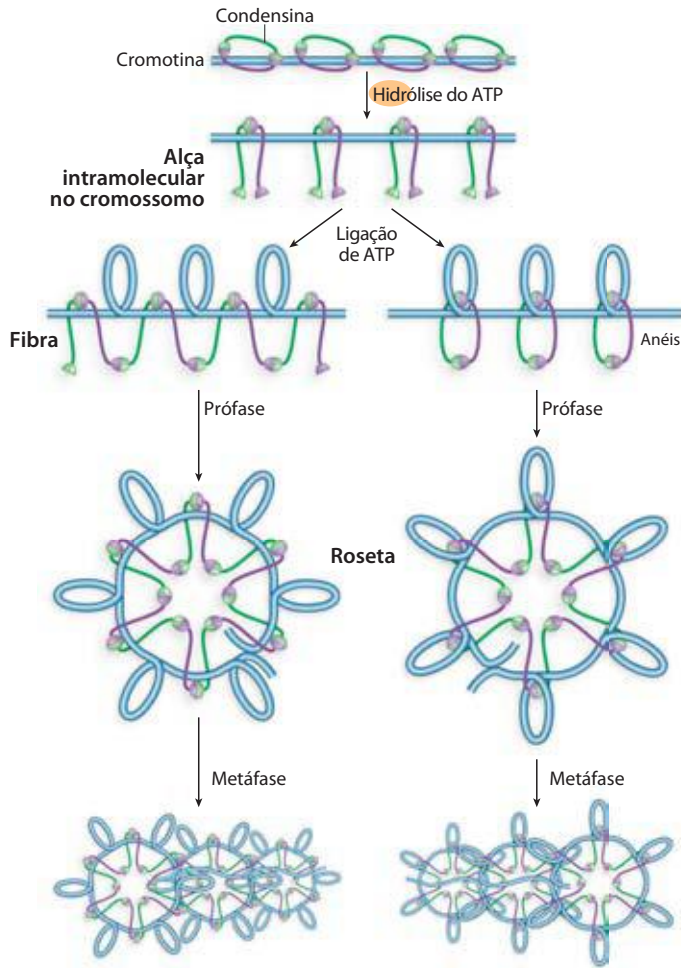



**FIGURA 24-33 O possível papel das condensinas na condensação da cromatina.** Inicialmente, o DNA é ligado à região de dobradiça da proteína SMC, no interior do que se torna um anel SMC intramolecular. A ligação de ATP leva a uma associação cabeça-cabeça, formando alças superespiraladas no DNA ligado. Rearranjos subsequentes das interações cabeça-cabeça para formar rosetas condensam o DNA. As condensinas podem organizar essas alças dos segmentos dos cromossomos de várias maneiras. Dois modelos atuais estão mostrados.

entra em mitose. Em condições laboratoriais, as condensinas se ligam ao DNA de maneira a criar supertorções positivas, isto é, a ligação de condensinas torna o DNA superenrolado, ao contrário daquele com o subenrolamento induzido pela ligação dos nucleossomos. Um modelo para o papel das condensinas na compactação da cromatina está mostrado na **Figura 24-33**. As coesinas e as condensinas são essenciais na orquestração das muitas mudanças que ocorrem na estrutura dos cromossomos durante o ciclo celular das células eucarióticas (**Figura 24-34**).

## O DNA das bactérias também é altamente organizado

Será considerada agora, brevemente, a estrutura dos cromossomos bacterianos. O DNA bacteriano é compactado em uma estrutura denominada **nucleoide**, que pode ocupar uma parte significativa do volume celular (**Figura 24-35**). O DNA parece estar ancorado em um ou mais pontos da face interna da membrana plasmática. Conhece-se muito menos sobre a estrutura do nucleoide do que sobre a cromatina dos eucariotos, entretanto, essa estrutura complexa vai aos poucos sendo revelada. Em *E. coli*, algo como um arcabouço parece organizar o cromossomo *circular* em uma série de cerca de 500 domínios em alças, cada um com uma média de 10.000 pb (**Figura 24-36**), como descrito para a cromatina. Esses domínios são topologicamente restritos; por exemplo,

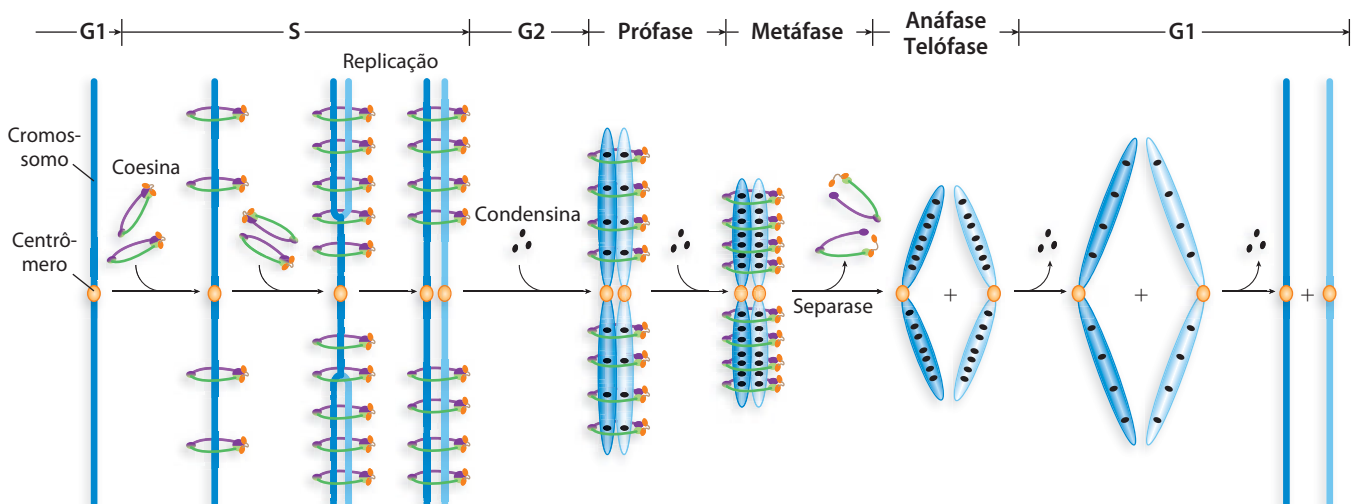



**FIGURA 24-34 Os papéis das coesinas e das condensinas no ciclo celular eucariótico.** As coesinas são depositadas sobre os cromossomos durante a fase G1 (ver Figura 24-24), unindo as cromátides-irmãs durante a replicação. Com o início da mitose, as condensinas se ligam e mantêm as cromátides em um estado condensado. Durante a anáfase, uma atividade denominada separase remove as ligações de coesina. Uma vez que as cromátides se separam, inicia a separação das condensinas, e os cromossomos retornam ao estado não condensado.

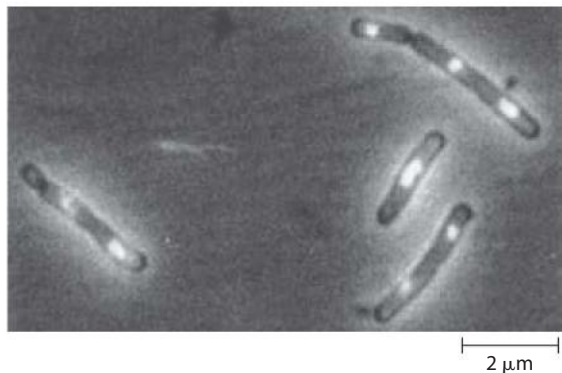



**FIGURA 24-35 Nucleoide de *E. coli*.** O DNA destas células está corado com um corante que emite fluorescência quando exposto à luz ultravioleta. As áreas claras definem o nucleoide. Observe que algumas células replicaram seu DNA, mas ainda não sofreram divisão celular e, portanto, apresentam muitos nucléolos.

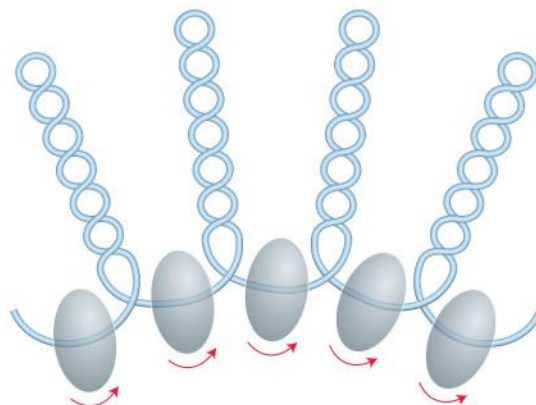



**FIGURA 24-36 Domínios em alça do cromossomo de *E. coli*.** Cada domínio tem um comprimento de cerca de 10.000 pb. Os domínios não são estáticos, mas se movem ao longo do DNA à medida que a replicação continua. Barreiras nos limites dos domínios, de composição desconhecida, evitam o relaxamento do DNA para além dos limites do domínio onde tenha ocorrido uma quebra. Os supostos complexos limítrofes estão mostrados na forma de estruturas ovoides em sombreado acinzentado. As setas indicam o movimento do DNA através dos limites dos complexos.

se o DNA for clivado em um domínio, apenas esse domínio será relaxado. Os domínios não têm finais fixos. Ao contrário, os limites estão provavelmente em constante movimentação ao longo do DNA, coordenados com a replicação do DNA. O DNA bacteriano não parece ter qualquer estrutura que possa se comparar com a organização proporcionada pelos nucleossomos nos eucariotos. Proteínas semelhantes a histonas são abundantes na *E. coli*, e o exemplo mais bem caracterizado é uma proteína de duas subunidades denominada HU ($M_r$ 19.000); no entanto, essas proteínas se ligam e se dissociam em minutos, e nunca foi observada uma estrutura regular DNA-histona estável. As mudanças estruturais dinâmicas do cromossomo bacteriano podem refletir uma necessidade de acesso mais fácil à informação genética. O ciclo de divisão celular bacteriana pode ser tão curto como 15 minutos, ao passo que uma célula eucariótica típica pode não se dividir em horas ou mesmo em meses. Além disso, uma proporção muito maior do DNA bacteriano é usada para codificar RNA e/ou produtos proteicos. Taxas mais altas de metabolismo celular nas bactérias significam que, em relação à maior parte das células eucarióticas, uma maior proporção do DNA está sendo transcrita ou replicada em dado momento.

Após essa visão geral da complexidade da estrutura do DNA, será apresentada, no próximo capítulo, uma discussão acerca do metabolismo do DNA.

## RESUMO 24.3 A estrutura dos cromossomos

- A unidade fundamental de organização na cromatina das células eucarióticas é o nucleossomo, que consiste em histonas e um segmento de DNA de 200 pb. O centro é uma partícula proteica contendo oito histonas (duas cópias de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4) circundada por um segmento de DNA (cerca de 146 pb) na forma de supertorção solenoide orientada para a esquerda.
- Os nucleossomos são organizados em fibras de 30 nm intensamente dobradas, fornecendo a compactação de 10.000 vezes, necessária para encaixar um cromossomo típico dentro do núcleo da célula. Os níveis mais elevados de enovelamento incluem a fixação a um suporte nuclear que contém histona H1, topoisomerase II e proteínas SMC. As proteínas SMC, principalmente as coesinas e as condensinas, desempenham papéis importantes na manutenção da organização dos cromossomos durante cada um dos estágios do ciclo celular.
- O cromossomo bacteriano se encontra intensamente compactado em um nucleoide, mas parece ser muito mais dinâmico e com estrutura mais irregular do que a cromatina dos eucariotos, refletindo o ciclo celular mais curto e a grande atividade metabólica de uma célula bacteriana.

## Termos-chave

*Os termos em negrito estão definidos no glossário.*

**cromossomo** 979
**fenótipo** 979
**mutação** 979
**gene** 980
**sequência regulatória** 980
**plasmídeo** 981
**íntron** 984
**éxon** 984
DNA de sequência simples 984
**DNA satélite** 984
**centrômero** 984
**telômero** 984
**supertorção** 985
**DNA relaxado** 985
**topologia** 986
subenrolamento 987
**número de ligação** 988
diferença de ligação específica 988
**densidade de super-hélice ($\sigma$)** 988
**topoisômeros** 989
rotação 989
torção 989
**topoisomerase** 990
**plectonêmica** 992
solenoide 993
**cromatina** 994
**histonas** 994
**nucleossomo** 994
**epigenético** 998
**eucromatina** 998
fibra de 30 nm 997
proteínas SMC 1000
coesinas 1000
condensinas 1000
**nucleoide** 1002

## Leituras adicionais


### Gerais

**Cox, M.M., Doudna, J.A., & O'Donnell, M.** (2012) *Molecular Biology: Principlas and Practice,* W. H. Freeman and Company, New York.

**Cozzarelli, N.R. & Wang, J.C. (eds.).** (1990) *DNA Topology and Its Biological Effects*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

**Kornberg, A. & Baker, T.A.** (1991) *DNA Replication*, 2nd. ed., W.H. Freeman & Company, New York.

Bom lugar para começar a obter mais informações sobre a estrutura e a função do DNA.

### Genes e cromossomos

**Campbel, A., Lichten, M., & Schupbach, G.** (2010) Telomeric strategies: means to an end. *Annu. Rev. Genet.* **44,** 243-269.

**Levin, H.L. & Moran, J.V.** (2011) Dynamic interactions between transposons and their hosts. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 615-627.

**McEachern, M.J., Krauskopf, A., & Blackburn, E.H.** (2000) Telomeres and their control. *Annu. Rev. Genet.* **34,** 331-358.

**Roy, S.W. & Gilbert, W.** (2006) The evolution of spliceosomal introns: patterns, puzzles, and progress. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 211-221.

**Verdaasdonk, J.S. & Bloom, K.** (2011) Centromeres: unique chromatin structures that drive chromosome segregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 320-332.

### Supertorção e topoisomerases

**Boles, T.C., White, J.H., & Cozzarelli, N.R.** (1990) Structure of plectonemically supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.* **213,** 931-951.

Estudo que define várias características fundamentais do DNA supertorcido.

**Garcia, H.G., Grayson, P., Han, L., Inamdar, M., Kondev, J., Nelson, P.C., Phillips, R., Widom, W., & Wiggins, P.A.** (2007) Biological consequences of tightly bent DNA: the other life of a macromolecular celebrity. *Biopolymers* **85,** 115-130.

Bela descrição da física do DNA dobrado.

**Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., & Collins, J.J.** (2010) How antibodies kill Bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 423-435.

**Lebowitz, J.** (1990) Through the looking glass: the discovery of supercoiled DNA. *Trends in Biochem. Sci.* **15,** 202-207.

Nota histórica curta e interessante.

**Pommier, Y.** (2006) Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat. Rev. Cancer* **6,** 789-802.

**Vos, S.M., Tretter, E.M., Schmidt, B.H., Berger, J.M.** (2011) All tangled up: how cells direct, manage, and exploit topoisomerase function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 827-841.

### Cromatina e nucleossomos

**Campos, E.I. & Reinberg, D.** (2009) Histones: annotating chromatin. *Annu. Rev. Genet.* 43, 559-599.

**Carter, S.D. & Sjogren, C.** (2012) The SMC complexes, DNA and chromosome topology: right or knot? *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 47, 1-16.

**Dillon, S.C. & Dorman, C.J.** (2010) Bacterial nucleoid-associated proteins: nucleoid structure and gene expression. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 185-195.

**Kornberg, R.D.** (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184,** 868-871.

Clássico artigo que introduziu o modelo de subunidades para a cromatina.

**Losada, A. & Hirano, T.** (2005) Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes Dev.* **19,** 1269-1287.

**Luijsterburg, M.S., White, M.F., van Driel, R., & Remus, T.D.** (2008) The major architects of chromatin: architectural proteins in bacteria, archea, and eukaryotes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **43**, 393-418.

**Margueron, R. Reinberg, D.** (2010) Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 285-296.

**Rando, O.J.** (2007) Chromatin structure in the genomics era. *Trends Genet.* **23,** 67-73.

Descrição dos métodos engenhosos usados para estudar padrões de modificação dos nucleossomos, posicionamento dos nucleossomos e outros aspectos da estrutura dos cromossomos em escala genômica.

**Segal, E., Fondufe-Mittendorf, Y., Chen, L., Thâström, A., Field, Y., Moore, I.K., Wang, J.Z., & Widom, J.** (2006) A genomic code for nucleosome positioning. *Nature* **442,** 772-778.


## Problemas

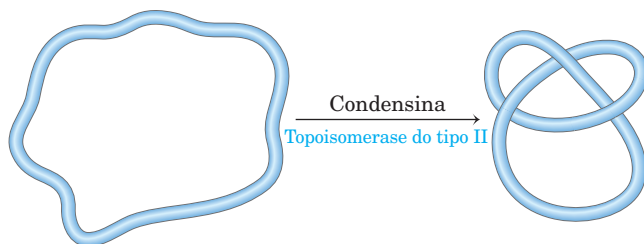
**1. Empacotamento do DNA em um vírus.** O bacteriófago T2 tem uma molécula de DNA de peso molecular $120 \times 10^6$, contido em uma cápsula com cerca de 210 nm de comprimento. Calcule o comprimento do DNA (supondo que o peso molecular de um par de nucleotídeos seja 650) e o compare com o tamanho da cápsula do T2.

**2. O DNA do fago M13.** A composição de bases do DNA do fago M13 é A, 23%, T, 36%, G, 21%, C, 20%. O que isso lhe diz a respeito do DNA do fago M13?

**3. O genoma do *Mycoplasma*.** O genoma da bactéria mais simples que se conhece, *Mycoplasma genitalium*, é uma molécula de DNA circular com 580.070 pb. Calcule o peso molecular e o comprimento do contorno (quando relaxado) dessa molécula. Qual o valor de $Lk_0$ do cromossomo do *Mycoplasma*? Se $\sigma = -0{,}06$, qual é o valor de $Lk$?

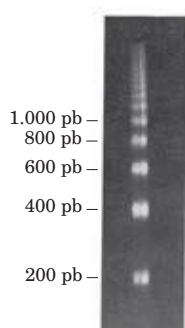
**4. O tamanho dos genes dos eucariotos.** Uma enzima isolada do fígado de rato tem 192 resíduos de aminoácidos e é codificada por um gene com 1.440 pb. Explique a relação entre o número de resíduos de aminoácidos na enzima e o número de pares de nucleotídeos desse gene.

**5. Número de ligação.** Uma molécula de DNA circular fechada, na sua forma relaxada, tem um $Lk$ de 500. Quantos pares de bases, aproximadamente, há nesse DNA? Como o número de ligação é alterado (aumenta, diminui, não muda, é indefinido) quando (a) um complexo proteico se liga formando um nucleossomo, (b) uma fita de DNA é quebrada, (c) DNA-girase e ATP são adicionados à solução de DNA ou (d) a dupla-hélice é desnaturada pelo calor?

**6. Topologia do DNA.** Na presença de condensina de eucarioto e de topoisomerase do tipo II, o $Lk$ de uma molécula de DNA circular fechado e relaxado não muda. Entretanto, o DNA fica cheio de nós.

A formação dos nós necessita de quebra do DNA, passagem de um segmento de DNA através da quebra e nova ligação pela topoisomerase. Uma vez que se pode esperar que cada reação da topoisomerase resulte em mudança do número de ligação, como é que o *Lk* pode permanecer o mesmo?

**7. Densidade da super-hélice.** O bacteriófago λ infecta *E. coli* integrando seu DNA ao cromossomo bacteriano. O sucesso dessa recombinação depende da topologia do DNA da *E. coli*. Quando a densidade da super-hélice ($\sigma$) do DNA da *E. coli* for maior do que $-0{,}045$, a probabilidade de integração é $< 20\%$; quando $\sigma$ for menor do que $-0{,}06$, a probabilidade é $\sim 70\%$. O DNA de um plasmídeo isolado de uma cultura de *E. coli* tem comprimento de 13.800 pb e *Lk* de 1.222. Calcule o $\sigma$ desse DNA e estabeleça um prognóstico acerca da probabilidade de o bacteriófago λ ser capaz de infectar essa cultura.

**8. Alterando o número de ligação.** (a) Qual é o *Lk* de uma molécula circular duplex de DNA de 5.000 pb com quebra em uma das fitas? (b) Qual é o *Lk* da molécula em (a) quando a quebra é soldada (relaxada)? (c) Quanto o *Lk* da molécula em (b) seria afetado pela ação, uma única vez, de uma molécula de topoisomerase I de *E. coli*? (d) Qual é o *Lk* da molécula em (b) após sofrer oito ciclos de catálise por uma molécula de DNA-girase em presença de ATP? (e) Qual é o *Lk* da molécula em (d) após quatro ciclos de catálise por uma molécula de topoisomerase I bacteriana? (f) Qual é o *Lk* da molécula em (d) após se ligar a um nucleossomo?

**9. Cromatina.** Uma das primeiras evidências que ajudaram os cientistas a definir a estrutura do nucleossomo está ilustrada no gel de agarose a seguir, no qual as bandas grossas representam DNA. Ele foi feito tratando brevemente a cromatina com uma enzima que degrada DNA e então removendo toda a proteína e submetendo o DNA purificado à eletroforese. Os números ao lado do gel indicam a posição na qual um DNA linear com o tamanho indicado migraria. O que esse gel mostra sobre a estrutura da cromatina? Por que as bandas de DNA são grossas e dispersas em vez de estarem bem definidas?

**10. Estrutura do DNA.** Explique por que o subenrolamento da hélice de um B-DNA pode facilitar ou estabilizar a formação de um Z-DNA.

**11. Manutenção da estrutura do DNA.** (a) Descreva duas características estruturais que uma molécula de DNA precisa ter para se manter em um estado supertorcido negativamente. (b) Liste três mudanças estruturais que são favorecidas quando uma molécula de DNA fica supertorcida negativamente. (c) Qual é a enzima que, com o auxílio do ATP, pode gerar uma super-helicidade negativa no DNA? (d) Descreva o mecanismo físico da ação dessa enzima.

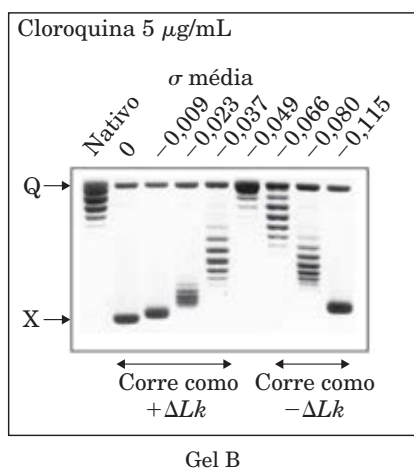
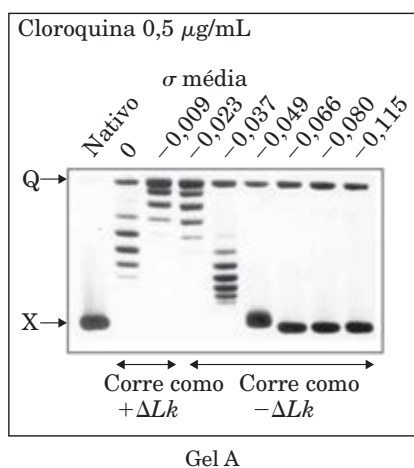
**12. Cromossomos artificiais de levedura (YAC).** Os YAC são usados para clonar segmentos grandes de DNA em células de levedura. Quais são os três tipos de sequência de DNA necessários para garantir a replicação e a propagação adequadas de um YAC em células de levedura?

**13. Estrutura do nucleoide em bactéria.** Em bactérias, a transcrição de um conjunto de genes é afetada pela topologia do DNA, sendo que a expressão aumenta ou, mais frequentemente, diminui quando o DNA é relaxado. Quando o cromossomo de uma bactéria é clivado em um ponto específico por uma enzima de restrição (enzima que cliva em uma sequência longa e, portanto, rara), apenas os genes das proximidades (10.000 pb) mostram aumento ou diminuição da expressão. A transcrição dos genes em outros sítios do cromossomo não é afetada. Explique. (Dica: ver Figura 24-36.)

**14. Topologia do DNA.** Quando o DNA é sujeito a eletroforese em gel de agarose, as moléculas pequenas migram mais rapidamente do que as grandes. DNA circulares fechados do mesmo tamanho, mas com diferentes números de ligação, também podem ser separados em gel de agarose: topoisômeros mais supertorcidos e, portanto, mais condensados migram mais rapidamente através do gel. No gel mostrado abaixo, o DNA de plasmídeo purificado migrou da parte superior para a parte inferior e tem duas bandas, com a banda mais rápida muito mais proeminente.

(a) Quais são as espécies de DNA nas duas bandas? (b) Se topoisomerase for adicionada a uma solução desse DNA, o que irá acontecer com a banda da parte superior e a banda da parte inferior após a eletroforese? (c) Se DNA-ligase for adicionada ao DNA, a aparência das bandas irá mudar? (d) Se DNA-girase mais ATP for adicionado ao DNA após a adição de DNA-ligase, como mudará o padrão de bandas?

**15. DNA-topoisomerases.** Quando o DNA é submetido à eletroforese em gel de agarose, as moléculas menores migram mais rápido do que as moléculas longas. DNA circulares do

mesmo tamanho, mas com diferenças quanto ao número de ligação, também podem ser separados em gel de agarose, pois os topoisômeros mais supertorcidos, e, portanto, mais condensados, migram mais rapidamente no gel – da parte superior para a inferior dos géis mostrados ao lado. Um corante, cloroquina, foi adicionado a esses géis. A cloroquina se intercala entre os pares de base e estabiliza uma estrutura de DNA mais desenrolada. Quando o gel se liga a um DNA circular relaxado, o DNA fica subenrolado onde o corante se liga, e as regiões onde o corante não se liga ficam com supertorções positivas para compensar. No experimento aqui mostrado, foram usadas topoisomerases para preparar o mesmo DNA circular com diferentes densidades de super-hélice ($\sigma$). O DNA completamente relaxado migra para a posição marcada com Q (de *quebra*), e o DNA altamente supertorcido (acima do limite no qual os topoisômeros podem ser individualizados) migra para a posição marcada com X.

Gel A

Gel B

(a) Por que no gel A a canaleta de $\sigma = 0$ (i.e., DNA preparado de modo a ter, em média, $\sigma = 0$) tem muitas bandas?

(b) No gel B, o DNA da preparação $\sigma = 0$ está supertorcido negativa ou positivamente na presença do corante?

(c) Nos dois géis, a canaleta $\sigma = -0{,}115$ tem duas bandas, uma com DNA relaxado e outra com DNA altamente supertorcido. Proponha uma razão para a presença de DNA relaxado nessas (e em outras) canaletas.

(d) O DNA nativo (mais à esquerda nos dois géis) é o mesmo DNA circular isolado das bactérias e que não recebeu tratamento. Qual é, aproximadamente, a densidade de super-hélice desse DNA nativo?

**16. Nucleossomos.** O genoma humano é constituído por um pouco mais de 3,1 bilhões de pares de bases. Assumindo que ele seja recoberto por nucleossomos espaçados como descrito no capítulo, quantas moléculas de histonas H2A estão presentes em uma célula somática humana?

## Problema de análise de dados

**17. Definindo os elementos funcionais dos cromossomos de levedura.** A Figura 24-8 mostra os elementos estruturais principais de um cromossomo de levedura de pão (*Saccharomyces cerevisiae*). As propriedades de alguns desses elementos foram determinadas por Heiter, Mann, Snyder e Davis (1985). Eles basearam seu estudo no achado de que, em células de levedura, os plasmídeos (que têm genes e origem de replicação próprios) agem, durante a mitose, diferentemente dos cromossomos (que têm esses elementos e ainda centrômeros e telômeros). Os plasmídeos não são manipulados pela maquinaria da mitose e segregam-se aleatoriamente entre as células-filhas. Sem um marcador seletivo que force a célula hospedeira a retê-los (ver Figura 9-4), esses plasmídeos são perdidos rapidamente. De maneira oposta, os cromossomos, mesmo sem marcador seletivo, são manipulados pela maquinaria da mitose e são perdidos a uma taxa muito baixa (cerca de $10^{-5}$ por divisão celular).

Heiter e colaboradores usaram como estratégia para determinar os componentes importantes dos cromossomos de levedura a construção de plasmídeos com várias partes dos cromossomos, observando então o quanto esses "cromossomos sintéticos" eram adequadamente segregados durante a mitose. Para medir a taxa de diferentes tipos de falha na segregação dos cromossomos, os pesquisadores precisaram de um rápido ensaio para determinar o número de cópias de cromossomos sintéticos presente em diferentes células. Esse ensaio se aproveitou do fato de que as colônias de levedura da linhagem selvagem são brancas, ao passo que certos mutantes que precisam de adenina ($ade^-$) produzem colônias vermelhas no meio de cultura. Especificamente, células *ade2*$^-$ não têm AIR-carboxilase funcional (a enzima da etapa 6a na Figura 22-35) e acumulam AIR (5-aminoimidazol-ribonucleotídeo) no citoplasma. Esse excesso de AIR é convertido no pigmento vermelho. A outra parte do ensaio envolve o gene *SUP11*, que codifica um supressor ocre (tipo de supressor sem sentido; ver Quadro 27-4), que suprime o fenótipo de alguns mutantes *ade2*$^-$.

Heiter e colaboradores começaram com uma linhagem de levedura diploide e homozigota para *ade2*$^-$ (essas células são vermelhas). Quando células mutantes contêm uma cópia de *SUP11*, o defeito metabólico é parcialmente suprimido, e as células são rosadas. Quando as células contêm duas ou mais cópias de *SUP11*, o defeito é completamente suprimido, e as células são brancas.

Os pesquisadores inseriram uma cópia de *SUP11* em cromossomos sintéticos com vários elementos que acreditavam serem importantes para a função dos cromossomos e observaram o quanto esses cromossomos passavam de uma geração a outra. As células rosadas foram plaqueadas em meio não seletivo, e o comportamento dos cromossomos sintéticos foi observado. Especificamente, Heiter e colaboradores procuravam colônias nas quais os cromossomos sintéticos eram inadequadamente segregados na primeira divisão celular após o plaqueamento, dando início a colônias com metade de um genótipo

e metade de outro. Uma vez que as células de levedura não se movimentam, essas colônias eram setorizadas: metade da colônia era de uma cor e metade de outra cor.

(a) Uma das maneiras de falha no processo mitótico é a *não disjunção*: os cromossomos se replicam, mas as cromátides-irmãs não se separam, e assim ambas as cópias do cromossomo terminam na mesma célula-filha. Explique por que a não disjunção dos cromossomos sintéticos origina colônias que são metade vermelha e metade branca.

(b) Outra maneira de falha no processo da mitose é a *perda de cromossomos*: os cromossomos não entram no núcleo das células-filhas ou não replicam. Explique por que a perda de cromossomos sintéticos dá origem a colônias metade vermelha e metade rosada.

Calculando a frequência dos diferentes tipos de colônia, Heiter e colaboradores puderam estimar a frequência desses eventos mitóticos aberrantes com os diferentes tipos de cromossomos sintéticos. Inicialmente, eles investigaram a necessidade de sequências centroméricas, construindo cromossomos sintéticos com fragmentos de DNA de diferentes tamanhos contendo um centrômero conhecido. Os resultados são mostrados a seguir.

| Cromossomo sintético | Tamanho do fragmento que contém o centrômero (kpb) | Perda de cromossomo (%) | Não disjunção (%) |
|---|---|---|---|
| 1 | Nenhum | — | >50 |
| 2 | 0,63 | 1,6 | 1,1 |
| 3 | 1,6 | 1,9 | 0,4 |
| 4 | 3,0 | 1,7 | 0,35 |
| 5 | 6,0 | 1,6 | 0,35 |

(c) Com base nesses dados, o que você pode concluir sobre o tamanho que o centrômero deve ter para uma segregação mitótica normal? Explique o raciocínio utilizado.

(d) É interessante observar que todos os cromossomos sintéticos criados nesses experimentos eram circulares e sem telômeros. Explique como eles conseguiram se replicar mais ou menos adequadamente.

A seguir, Heiter e colaboradores construíram uma série de cromossomos sintéticos lineares que incluíam sequências funcionais de centrômeros e também telômeros e então mediram a taxa total de erro mitótico (% perda + % de não disjunção) em função do tamanho:

| Cromossomo sintético | Tamanho (kpb) | Frequência total de erro (%) |
|---|---|---|
| 6 | 15 | 11,0 |
| 7 | 55 | 1,5 |
| 8 | 95 | 0,44 |
| 9 | 137 | 0,14 |

(e) Com base nesses dados, o que se pode concluir sobre o tamanho que um cromossomo deve ter para uma segregação mitótica normal? Explique o seu raciocínio.

(f) Os cromossomos normais de levedura são lineares, com um comprimento variando entre 250 kpb e 2.000 kpb, e têm taxa de erro mitótico de cerca de $10^{-5}$ por divisão celular. Extrapolando os resultados de (e), as sequências de telômeros e centrômeros usadas nesses experimentos explicam a estabilidade mitótica de cromossomos normais de levedura ou deve haver o envolvimento de outros elementos? Explique o seu raciocínio. (Dica: um gráfico do log da taxa de erro *versus* o comprimento será útil.)

## Referência

**Heiter, P., Mann, C., Snyder, M, & Davis, R.W.** (1985) Mitotic stability of yeast chromosomes: a colony color assay that measures nondisjunction and chromosome loss. *Cell* **40,** 381-392.

# 25

# Metabolismo do DNA



Como repositório de informação genética, o DNA ocupa um lugar único e central entre as macromoléculas biológicas. As sequências de nucleotídeos de DNA codificam as estruturas primárias de todos os RNAs e proteínas celulares e, por meio de enzimas, afetam indiretamente a síntese de todos os outros constituintes celulares. Essa passagem de informação do DNA para o RNA e proteínas orienta o tamanho, forma e funcionamento de todos os seres vivos.

O DNA é um dispositivo maravilhoso para o armazenamento estável da informação genética. A expressão "armazenamento estável", entretanto, transmite uma imagem estática e enganosa. Ela não consegue captar a complexidade dos processos pelos quais a informação genética é preservada em um estado não corrompido e, então, transmitida de uma geração de células para a seguinte. O metabolismo do DNA compreende tanto o processo que dá origem a cópias fiéis de moléculas de DNA (replicação) quanto os processos que afetam a estrutura inerente da informação (reparo e recombinação). Juntas, essas atividades são o foco deste capítulo.

O metabolismo do DNA é moldado pela exigência de um grau de requinte de precisão. A química da junção de um nucleotídeo com o seguinte na replicação do DNA é elegante e aparentemente simples. Entretanto, como acontece em todos os polímeros que contêm informações, formar uma ligação covalente entre duas unidades monoméricas é apenas uma pequena parte do processo bioquímico. Como será visto, a complexidade surge na forma de dispositivos enzimáticos para garantir que o nucleotídeo *correto* seja adicionado e que a informação genética seja transmitida intacta. Erros não corrigidos que surgem durante a síntese do DNA podem ter terríveis consequências, não só porque podem afetar ou eliminar permanentemente a função de um gene, mas também porque a alteração é hereditária.

As enzimas que sintetizam o DNA podem copiar moléculas de DNA que contêm milhões de bases. Elas o fazem com fidelidade e velocidade extraordinárias, apesar do substrato de DNA ser altamente compactado e ligado a outras proteínas. A formação das ligações de fosfodiésteres para unir nucleotídeos no esqueleto de uma fita de DNA em formação é, portanto, apenas parte de um processo elaborado que requer inúmeras proteínas e enzimas.

Manter a integridade da informação genética encontra-se no centro do reparo do DNA. Como detalhado no Capítulo 8, o DNA é suscetível a vários tipos de reações que o danificam. Tais reações são incomuns, mas significativas, devido à tolerância biológica muito baixa a alterações na sequência do DNA. O DNA é a única macromolécula para a qual existem sistemas de reparo; o número, diversidade e complexidade dos mecanismos de reparo do DNA refletem a ampla variedade de injúrias que podem danificá-lo.

As células podem reorganizar a sua informação genética por processos coletivamente chamados de recombinação – aparentemente minando o princípio de que a estabilidade e a integridade da informação genética são fundamentais. Entretanto, a maioria dos rearranjos de DNA, de fato, desempenha papéis construtivos na manutenção da integridade genômica, contribuindo de modo especial para a replicação do DNA, reparo do DNA e segregação cromossômica.

Ênfase especial é dada neste capítulo às *enzimas* do metabolismo do DNA. Elas merecem estudo cuidadoso não apenas por sua importância biológica intrínseca, mas também por sua crescente importância na medicina, e por sua utilização diária como reagentes em uma ampla variedade de tecnologias bioquímicas modernas. Muitas das importantes descobertas no metabolismo do DNA foram feitas com a *Escherichia coli*, por isso suas enzimas bem conhecidas são geralmente utilizadas para ilustrar as regras básicas. Uma rápida olhada em alguns genes relevantes no mapa genético de *E. coli* (**Figura 25-1**) fornece apenas uma sugestão da complexidade dos sistemas enzimáticos envolvidos no metabolismo do DNA.

Antes de um olhar mais próximo na replicação, deve-se fazer um comentário sobre o uso de abreviaturas na identificação de genes de bactérias e proteínas – você encontrará muitas delas neste capítulo e nos capítulos posteriores. Genes de eucariontes também são identificados por convenções semelhantes, embora a forma exata das abreviações possa variar de acordo com as espécies e nenhuma convenção única se aplique a todos os sistemas de eucariontes.

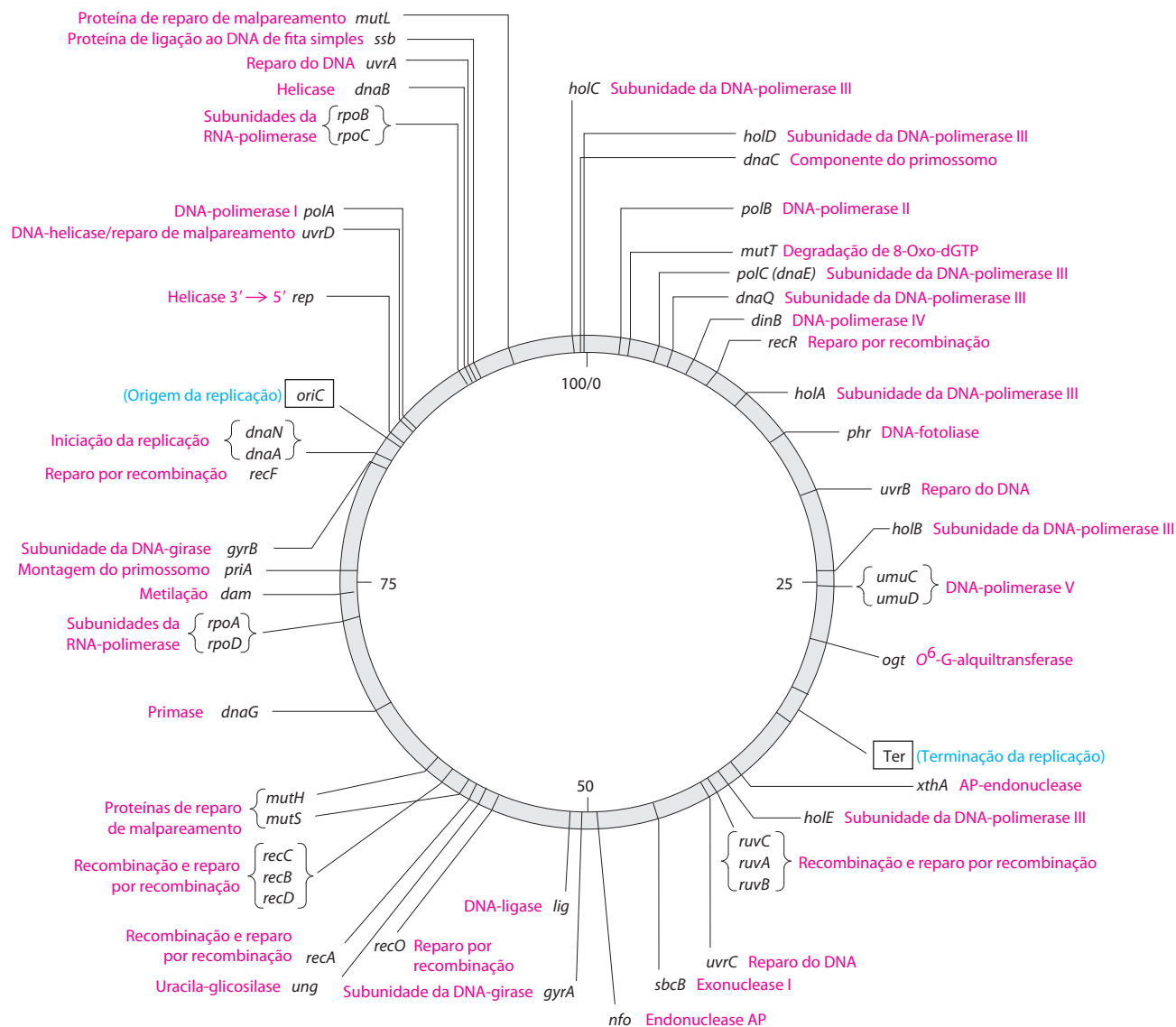



**FIGURA 25-1 Mapa do cromossomo de *E. coli*.** O mapa mostra as posições relativas dos genes que codificam muitas das proteínas importantes no metabolismo do DNA. O número de genes envolvidos fornece uma dica a respeito da complexidade destes processos. Os números 0 a 100 dentro do cromossomo circular indicam uma medida genética chamada minutos. Cada minuto corresponde a ~40.000 pb ao longo da molécula de DNA. Os nomes dos genes em três letras e outros elementos geralmente refletem algum aspecto da sua função e incluem *mut*, *mut*agênese; *dna*, replicação do DNA; *pol*, DNA-*pol*imerase; *rpo*, RNA-*po*limerase; *uvr*, resistência à *UV*; *rec*, *rec*ombinação; *dam*, metilação de *a*deninas no DNA; *lig*, DNA-*lig*ase; Ter, *ter*minação da replicação, e ori, *ori*gem da replicação (*oriC* em *E. coli*, como mostrado nesta figura).

**CONVENÇÃO-CHAVE:** Genes bacterianos em geral são identificados utilizando-se três letras minúsculas, em itálico, que muitas vezes refletem a função aparente de um gene. Por exemplo, os genes *dna*, *uvr* e *rec* afetam a replicação do DNA, a resistência aos efeitos nocivos da radiação *UV* e a recombinação, respectivamente. Onde vários genes afetam o mesmo processo, a letras *A*, *B*, *C* e assim por diante, são adicionadas – p. ex., no *dnaA*, *dnaB*, *dnaQ*, – geralmente refletindo sua ordem de descoberta e não sua ordem em uma sequência de reação. ■

A utilização de abreviaturas na nomeação de proteínas é menos direta. Durante investigações genéticas, o produto proteico de cada gene é geralmente isolado e caracterizado. Muitos genes bacterianos foram identificados e nomeados antes que os papéis de seus produtos proteicos fossem compreendidos em detalhe. Algumas vezes, descobre-se que o produto gênico é uma proteína isolada previamente, e ocorrem algumas renomeações. Frequentemente, no entanto, o produto vem a ser uma proteína ainda desconhecida, com uma atividade não descrita facilmente por um simples nome de enzima.

**CONVENÇÃO-CHAVE:** Proteínas bacterianas muitas vezes mantêm o nome de seus genes. Ao se referir ao produto proteico de um gene de *E. coli*, utiliza-se o tipo romano e a primeira letra é maiúscula: por exemplo, os produtos gênicos *dnaA* e *recA* e as proteínas DnaA e RecA, respectivamente. ■

## 25.1 Replicação do DNA

Muito antes da estrutura do DNA ser conhecida, os cientistas queriam conhecer a origem da capacidade dos organismos de criar cópias fiéis de si mesmos e, mais tarde, a respeito da capacidade das células de produzirem cópias idênticas de grandes e complexas macromoléculas. A especulação sobre esses problemas se concentrou em torno do conceito de **molde**, estrutura que permitiria que as moléculas se alinhassem em uma ordem específica e se ligassem criando uma macromolécula com uma sequência e função específicas. A década de 1940 trouxe a revelação de que o DNA era a molécula genética, mas só depois de James Watson e Francis Crick deduzirem sua estrutura realmente se tornou claro o mecanismo pelo qual o DNA atuava como molde para a replicação e transmissão da informação genética: *uma fita é o complemento da outra*. As regras estritas do pareamento de bases significam que cada fita fornece um molde para uma nova fita com uma sequência previsível e complementar (ver Figuras 8-14, 8-15). **Nucleotídeos: blocos de construção de ácidos nucleicos**

Ficou provado que as propriedades fundamentais do processo de replicação do DNA e os mecanismos utilizados pelas enzimas que o catalisam são, em essência, idênticos em todas as espécies. Essa unidade de mecanismos é um tema central à medida que se prossegue a partir de propriedades gerais do processo de replicação para a replicação de enzimas de *E. coli* e, finalmente, para a replicação em eucariontes.

### A replicação do DNA segue um conjunto de regras fundamentais

A pesquisa inicial sobre a replicação do DNA bacteriano e suas enzimas ajudou a estabelecer várias propriedades básicas que se mostraram aplicáveis à síntese do DNA em todos os organismos.

**A replicação do DNA é semiconservativa** Cada fita de DNA funciona como molde para a síntese de uma nova fita, produzindo duas novas moléculas de DNA, cada qual com uma fita nova e uma fita antiga. Isso é a **replicação semiconservativa**.

Watson e Crick propuseram a hipótese de replicação semiconservativa logo após a publicação de seu artigo de 1953 sobre a estrutura do DNA, e a hipótese foi comprovada por experimentos engenhosamente projetados, realizados por Matthew Meselson e Franklin Stahl em 1957. Meselson e Stahl cultivaram células de *E.coli* por várias gerações em um meio em que a única fonte de nitrogênio ($NH_4Cl$) continha $^{15}N$, o isótopo "pesado" de nitrogênio, no lugar do isótopo normal $^{14}N$, "leve", mais abundante. O DNA isolado dessas células apresentava uma densidade de cerca de 1% maior do que o normal [$^{14}N$]DNA (**Figura 25-2a**). Embora essa diferença seja pequena, a mistura de [$^{15}N$]DNA pesado e [$^{14}N$]DNA leve pode ser separada por centrifugação até o equilíbrio em um gradiente de densidade de cloreto de césio.

As células de *E. coli* cultivadas em um meio de $^{15}N$ foram transferidas para um novo meio contendo apenas o isótopo $^{14}N$, em que foram deixadas crescendo até que sua população tivesse dobrado. O DNA isolado dessa primeira geração de células formava uma *única* banda no gradiente de CsCl, em uma posição que indicava que as moléculas de DNA de dupla-hélice das células-filhas eram híbridas, contendo uma nova fita $^{14}N$ e uma fita parental $^{15}N$ (Figura 25-2b).

Esse resultado argumentou contra a replicação conservativa, a hipótese alternativa em que um dos resultados da replicação de uma molécula de DNA consistiria em duas fitas recentemente sintetizadas de DNA e o outro conteria as duas fitas parentais; isso não produziria moléculas de DNA híbridas no experimento de Meselson-Stahl. A hipótese de replicação semiconservativa obteve mais apoio na etapa seguinte do experimento (Figura 25-2c). As células foram novamente colocadas em crescimento até dobrar em número em um meio com $^{14}N$. O produto de DNA isolado desse segundo ciclo de replicação exibiu *duas* bandas no gradiente de densidade, uma com densidade igual àquela do DNA leve e a outra com a densidade do DNA híbrido observada após a primeira duplicação celular.

**FIGURA 25-2 Experimento de Meselson-Stahl. (a)** Células foram cultivadas por muitas gerações em meio contendo apenas nitrogênio pesado, $^{15}N$, de modo que todo nitrogênio no DNA fosse $^{15}N$, como mostrado pela banda única (azul) quando centrifugado em um gradiente de CsCl. **(b)** Uma vez que as células foram transferidas para um meio contendo apenas nitrogênio leve, $^{14}N$, o DNA celular isolado após uma geração se equilibrou em uma posição mais alta no gradiente de densidade (banda roxa). **(c)** Um segundo ciclo de replicação gerou uma banda de DNA híbrido (roxo) e outra banda (roxo), contendo apenas [$^{14}N$]DNA, confirmando a replicação semiconservativa.

**A replicação começa em uma origem e em geral segue bidirecionalmente** Após a confirmação de um mecanismo de replicação semiconservativo, várias questões surgiram. As fitas de DNA parentais são completamente desenroladas antes que cada uma seja replicada? A replicação se inicia em locais aleatórios ou em um único ponto? Após a iniciação em qualquer ponto do DNA, a replicação segue em uma direção ou em ambas?

Uma indicação inicial de que a replicação é um processo altamente coordenado no qual as fitas parentais são simultaneamente desenroladas e replicadas foi fornecido por John Cairns, utilizando autorradiografias. Ele produziu um DNA de *E. coli* radioativo cultivando células em um meio contendo timidina marcada com trítio ($^3$H). Quando o DNA foi cuidadosamente isolado, espalhado e coberto com uma emulsão fotográfica por várias semanas, os resíduos de timidina radioativos geraram "rastros" de grãos de prata na emulsão, produzindo uma imagem da molécula de DNA. Esses rastros revelaram que o cromossomo intacto de *E. coli* é um círculo único enorme, com 1,7 mm de comprimento. O DNA radioativo isolado das células durante a replicação mostrou uma volta adicional (**Figura 25-3**). Cairns concluiu que a volta resultava da formação de duas fitas filhas radioativas, cada uma complementar a uma fita parental. Uma ou ambas as extremidades da volta são pontos dinâmicos, denominados de **forquilhas de replicação**, onde o DNA parental está sendo desenrolado e as fitas separadas rapidamente replicadas. Os resultados de Cairns demonstraram que ambas as fitas de DNA são replicadas simultaneamente, e variações no seu experimento indicaram que a replicação de cromossomos bacterianos é bidirecional: ambas as extremidades da volta possuem forquilhas de replicação ativas.

Determinar se as voltas de replicação se originam em um único ponto no DNA requer marcações ao longo da molécula de DNA. Elas foram fornecidas por uma técnica chamada de **mapeamento de desnaturação**, desenvolvida por Ross Inman e colaboradores. Utilizando o cromossomo de 48.502 pb do bacteriófago λ, Inman demonstrou que o DNA poderia ser seletivamente desnaturado em sequências extraordinariamente ricas em pares de bases A═T, gerando um padrão reproduzível de bolhas de fitas simples (ver Figura 8-28). O DNA isolado contendo voltas de replicação pode ser parcialmente desnaturado do mesmo modo. Isso permite que a posição e o progresso das forquilhas de replicação sejam medidos e mapeados, utilizando as regiões desnaturadas como pontos de referência. A técnica revelou que nesse sistema as voltas de replicação sempre se iniciam em um único ponto, chamado de **origem**. Ele também confirmou a observação inicial de que a replicação é geralmente bidirecional. Para moléculas de DNA circulares, as duas forquilhas de replicação se encontram em um ponto do lado do círculo oposto ao de origem. Origens específicas de replicação já foram identificadas e caracterizadas em bactérias e eucariontes inferiores.

**A síntese de DNA segue em uma direção 5′→3′ e é semidescontínua** Uma nova fita de DNA é sempre sintetizada na direção 5′→3′, com a 3′OH livre como o ponto no qual o DNA é alongado (as extremidades 5′ e 3′ de uma fita de DNA são definidas na Figura 8-7). Como as duas fitas de DNA são antiparalelas, a fita que serve de molde é lida a partir da extremidade 3′ em direção à extremidade 5′.

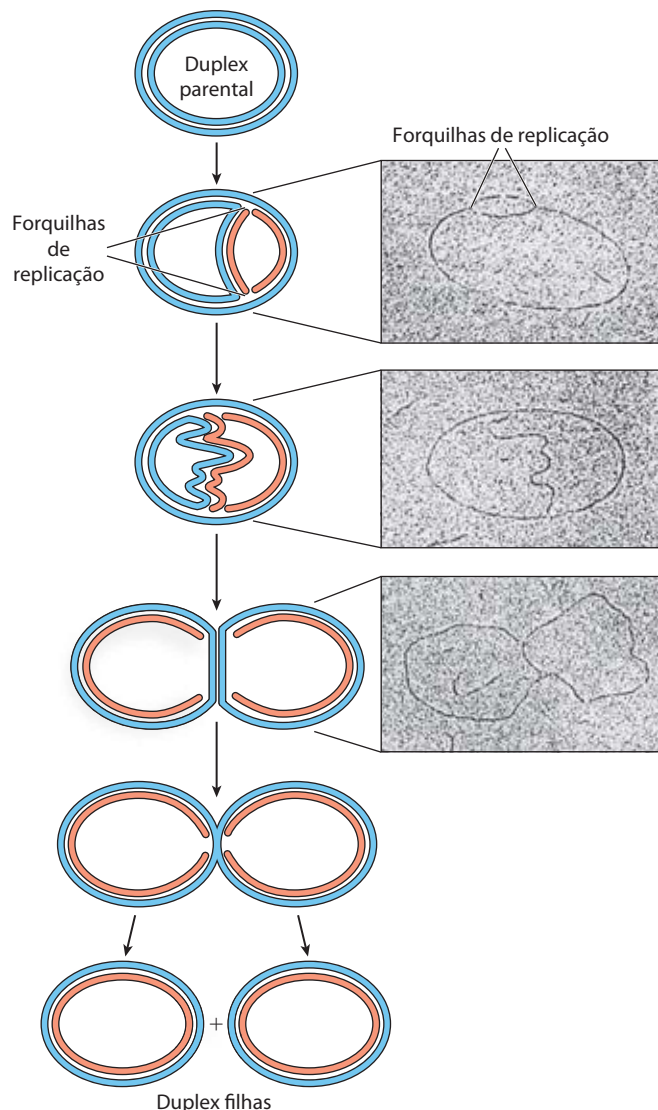



**FIGURA 25-3 Visualização da replicação do DNA.** Os estágios na replicação das moléculas de DNA circular foram visualizados na microscopia eletrônica. A replicação de um cromossomo circular produz uma estrutura que lembra a letra grega teta, $\theta$, uma vez que ambas as fitas são replicadas simultaneamente (novas fitas mostradas em cor salmão). As eletromicrografias mostram imagens de plasmídeos de DNA sendo replicados a partir de uma única origem de replicação.

Se a síntese sempre segue na direção 5′→ 3′, como podem ambas as fitas serem sintetizadas simultaneamente? Se ambas as fitas fossem sintetizadas *continuamente* enquanto a forquilha de replicação se movia, uma fita deveria passar por uma síntese de 3′→5′. Esse problema foi resolvido por Reiji Okazaki e colaboradores na década de 1960. Okazaki descobriu que uma das novas fitas de DNA é sintetizada em pedaços pequenos, atualmente denominados de **fragmentos de Okazaki**. Esse trabalho levou à conclusão final de que uma fita é sintetizada continuamente e a outra descontinuamente (**Figura 25-4**). A fita contínua, ou **fita líder**, é aquela em que a síntese 5′→3′ segue na mesma direção do movimento da forquilha de replicação. A fita descontínua, ou

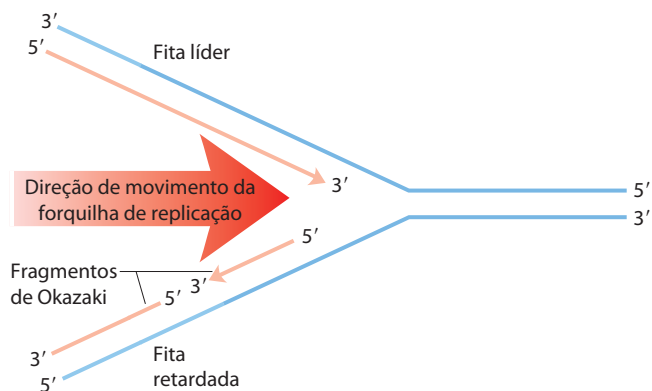



**FIGURA 25-4 Definindo as fitas de DNA na forquilha de replicação.** Uma nova fita de DNA (vermelho-claro) sempre é sintetizada na direção 5′→3′. O molde é lido na direção oposta, 3′→5′. A fita líder é sintetizada continuamente na direção adotada pela forquilha de replicação. A outra fita, retardada, é sintetizada descontinuamente em pequenos pedaços (fragmentos de Okazaki) em uma direção oposta àquela em que a forquilha de replicação se move. Os fragmentos de Okazaki são ligados pela DNA-ligase. Em bactérias, os fragmentos de Okazaki têm ~1.000 a 2.000 nucleotídeos de comprimento. Nas células de eucariontes eles têm 150 a 200 nucleotídeos de comprimento.

**fita retardada**, é aquela em que a síntese 5′→3′ prossegue na direção *oposta* da direção do movimento da forquilha. Os fragmentos de Okazaki variam em comprimento desde poucas centenas até poucos milhares de nucleotídeos, dependendo do tipo celular. Como será visto adiante, as sínteses da fita líder e retardada são fortemente coordenadas.

## O DNA é degradado por nucleases

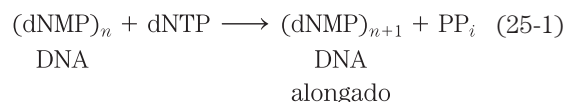
Para explicar a enzimologia da replicação do DNA, primeiro serão apresentadas as enzimas que degradam o DNA em vez de sintetizá-lo. Essas enzimas são conhecidas como **nucleases** ou **DNases**, se forem específicas para o DNA e não para RNA. Cada célula contém várias nucleases diferentes, pertencendo a dois tipos de classes amplas: exonucleases e endonucleases. As **exonucleases** degradam os ácidos nucleicos de uma extremidade da molécula. Muitas operam apenas na direção 5′→3′ ou 3′→5′, removendo nucleotídeos apenas a partir da extremidade 5′ ou 3′, respectivamente, de uma fita de um ácido nucleico de fita dupla ou de um DNA de fita simples. As **endonucleases** podem iniciar a degradação em sítios internos específicos em uma fita ou molécula de ácido nucleico, reduzindo-a a fragmentos cada vez menores. Poucas exonucleases e endonucleases degradam apenas DNA de fita simples. Há algumas poucas importantes classes de endonucleases que clivam apenas em sequências específicas de nucleotídeos (tais como as endonucleases de restrição tão importantes em biotecnologia; ver Capítulo 9, Figura 9-2). Você encontrará muitos tipos de nucleases neste e em capítulos subsequentes.

## O DNA é sintetizado por DNA-polimerases

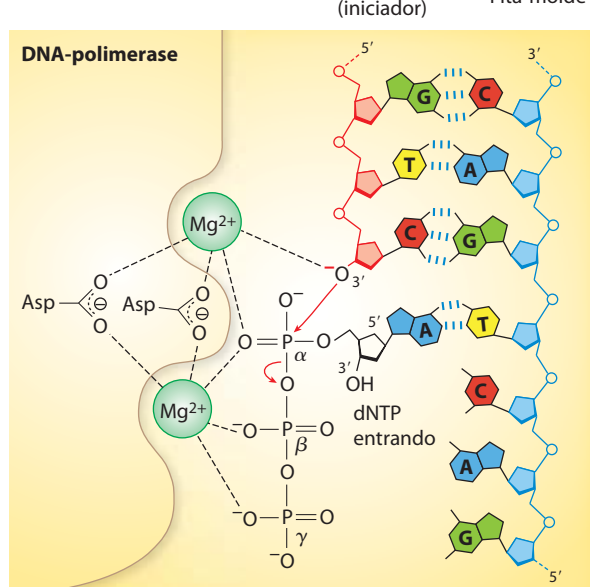
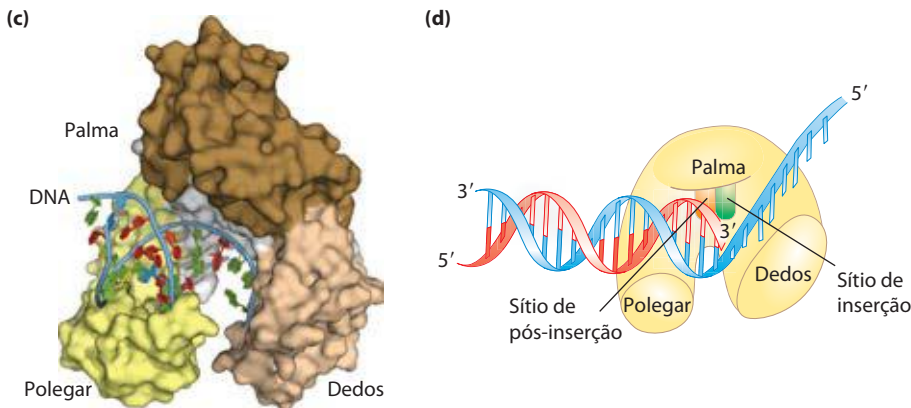
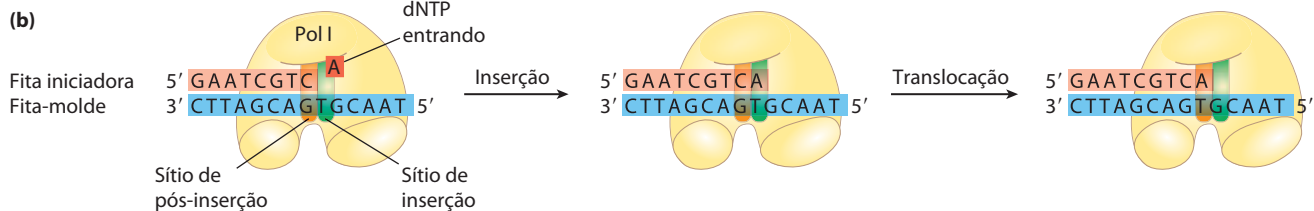
A busca por uma enzima que poderia sintetizar o DNA começou em 1955. O trabalho de Arthur Kornberg e colaboradores levou à purificação e caracterização de uma DNA-polimerase de células de *E. coli*, uma enzima de um único polipeptídeo atualmente denominada **DNA-polimerase I** ($M_r$ 103.000; codificada pelo gene *polA*). Bem mais tarde, investigadores descobriram que a *E. coli* contém, pelo menos, quatro outras DNA-polimerases distintas, descritas a seguir.

Arthur Kornberg, 1918–2007

Estudos detalhados da DNA-polimerase I revelaram características do processo de síntese do DNA que agora se sabem são comuns a todas as DNA-polimerases. A reação fundamental é a transferência do grupo fosforil. O nucleófilo é o grupo 3′-hidroxila do nucleotídeo na extremidade 3′ da fita em crescimento. O ataque nucleofílico ocorre no fósforo $\alpha$ do desoxinucleosídeo-5′-trifosfato que chega (**Figura 25-5a**). O pirofosfato inorgânico é liberado na reação. A reação geral é

$$\underset{\text{DNA}}{(\text{dNMP})_n} + \text{dNTP} \longrightarrow \underset{\substack{\text{DNA} \\ \text{alongado}}}{(\text{dNMP})_{n+1}} + \text{PP}_i \quad (25\text{-}1)$$

onde dNMP e dNTP são desoxinucleosídeos 5′-monofosfato e 5′-trifosfato, respectivamente. A catálise por praticamente todas as DNA-polimerases envolve principalmente dois íons de $Mg^{2+}$ no sítio ativo (Figura 25-5a). Um desses auxilia a retirar o próton do grupo 3′-hidroxila, tornando-o um nucleófilo mais eficaz. O outro se liga ao dNTP de entrada e facilita sua saída do pirofosfato.

A reação parece prosseguir com apenas uma alteração mínima na energia livre, uma vez que uma ligação fosfodiéster é formada à custa de um anidrido fosfato um pouco menos estável. Entretanto, o empilhamento de bases não covalentes e as interações de pareamento de bases fornecem estabilização adicional ao produto alongado de DNA em relação ao nucleotídeo livre. Além disso, a formação de produtos é facilitada na célula pelos 19 kJ/mol gerados na posterior hidrólise do produto de pirofosfato, pela enzima pirofosfatase (p. 524).

Trabalhos recentes com a DNA-polimerase I levaram à definição de duas exigências centrais para a polimerização do DNA (Figura 25-5). Em primeiro lugar, todas as DNA-polimerases precisam de um molde. A reação de polimerização é guiada por uma fita-molde de DNA, de acordo com as regras de pareamento de bases previstas por Watson e Crick: onde uma guanina está presente em um molde, um desoxinucleotídeo citosina é adicionado à nova fita, e assim por diante. Essa foi uma descoberta particularmente importante, não apenas porque forneceu uma base química para uma replicação de DNA semiconservativa precisa, mas também porque representou o primeiro exemplo da utilização de um molde como guia para uma reação biossintética.

**MECANISMO – FIGURA 25-5 Alongamento da cadeia de DNA.** **(a)** O mecanismo catalítico para a adição de um novo nucleotídeo pela DNA-polimerase envolve dois íons $Mg^{2+}$, coordenados aos grupos fosfato do nucleotídeo trifosfato que chega, ao grupo 3′ hidroxila que atuará como nucleófilo e três resíduos Asp, dois dos quais são altamente conservados em todas as DNA-polimerases. O íon $Mg^{2+}$ representado na parte de cima facilita o ataque do grupo 3′ hidroxila do iniciador ao fosfato $\alpha$ do nucleotídeo trifosfato; o outro íon $Mg^{2+}$ facilita o deslocamento do pirofosfato. Ambos os íons estabilizam a estrutura do estado de transição pentacovalente. As RNA-polimerases usam um mecanismo semelhante (ver Figura 26-1a). **(b)** A atividade da DNA-polimerase I também precisa de uma fita simples não pareada para atuar como molde e uma fita iniciadora para fornecer o grupo hidroxila livre na extremidade 3′, à qual a nova unidade de nucleotídeo é adicionada. Cada nucleotídeo que chega é selecionado em parte pelo pareamento de bases ao nucleotídeo apropriado na fita-molde. O produto da reação tem uma nova hidroxila 3′ livre, permitindo a adição de outro nucleotídeo. O par de bases recentemente formado migra para deixar o sítio ativo disponível para o próximo par a ser formado. **(c)** O núcleo da maioria das polimerases tem um formato semelhante ao de uma mão humana que envolve o sítio ativo. A estrutura mostrada é a DNA-polimerase I de *Thermus aquaticus*, ligada ao DNA (PDB ID 4KTQ). **(d)** Uma interpretação do desenho da estrutura da DNA-polimerase mostra as partes de inserção e pós-inserção no sítio ativo. O sítio de inserção é onde ocorre a adição de nucleotídeos, e o sítio de pós-inserção é o local para onde o par de bases recentemente formado migra depois que aparece. **Polimerização de nucleotídeos pela DNA-polimerase**

Em segundo lugar, as polimerases precisam de um ***primer*** (iniciador). Um iniciador é um segmento de fita (complementar ao molde) com um grupo 3′-hidroxila livre, ao qual um nucleotídeo pode ser adicionado; a extremidade 3′ livre do iniciador é chamada de **terminal do iniciador**. Em outras palavras, parte dessa nova fita já deve estar no lugar: todas as DNA-polimerases só podem adicionar nucleotídeos a uma fita preexistente. Muitos iniciadores são oligonucleotídeos de RNA em vez de DNA, e enzimas especializadas sintetizam iniciadores quando e onde são necessários.

Um sítio ativo de DNA-polimerase tem duas partes (Figura 25-5b). O nucleotídeo que chega é inicialmente posicionado *no* **sítio de inserção**. Uma vez que a ligação fosfodiéster é formada, a polimerase desliza para frente no DNA e um novo par de bases é posicionado no **sítio de pós-inserção**. Esses elementos estão localizados em um bolso que se assemelha à palma de uma mão (Figura 25-5c).

Após a adição de um nucleotídeo em uma fita de DNA em crescimento, uma DNA-polimerase pode tanto se dissociar como se mover ao longo do molde e adicionar outro nucleotídeo. A dissociação e a reassociação da polimerase podem limitar a taxa de polimerização geral – o processo é geralmente mais rápido quando uma polimerase adiciona mais nucleotídeos sem se dissociar do molde. O número médio de nucleotídeos adicionados antes da dissociação de uma polimerase define sua **processividade**. DNA-polimerases variam muito em processividade; algumas adicionam apenas alguns poucos nucleotídeos antes de sua dissociação, outras adicionam muitos milhares. **Polimerização de nucleotídeos pela DNA-polimerase**

## A replicação tem alto grau de precisão

A replicação prossegue com extraordinário grau de fidelidade. Em *E. coli*, um erro acontece apenas a cada $10^9$ a $10^{10}$ nucleotídeos adicionados. Para o cromossomo de *E. coli* de aproximadamente $4{,}6 \times 10^6$ pb, isso significa que um erro ocorre apenas uma vez por 1.000 a 10.000 replicações. Durante a polimerização, a diferenciação entre nucleotídeos corretos e incorretos depende não apenas das ligações de hidrogênio que especificam o pareamento correto entre bases complementares, mas também da geometria comum dos pares de bases A═T padrão e G≡C (**Figura 25-6**). O sítio ativo da DNA-polimerase I acomoda apenas pares de bases com essa geometria. Um nucleotídeo incorreto pode ser capaz de fazer uma ligação de hidrogênio com uma base no molde, mas ele geralmente não se encaixará no sítio ativo. Bases incorretas podem ser rejeitadas antes que a ligação fosfodiéster seja formada.

A precisão da reação de polimerização em si, no entanto, é insuficiente para explicar o alto grau de fidelidade na replicação. Medições cuidadosas *in vitro* mostraram que as DNA-polimerases inserem um nucleotídeo incorreto para cada $10^4$ a $10^5$ inserções corretas. Esses erros algumas vezes ocorrem porque uma base está brevemente em uma forma tautomérica incomum (ver Figura 8-9), permitindo que se ligue por ligação de hidrogênio com um parceiro incorreto. *In vivo*, a taxa de erro é reduzida por mecanismos enzimáticos adicionais.

Um mecanismo intrínseco a praticamente todas as DNA-polimerases é uma atividade de exonuclease separada 3′→5′ que realiza uma dupla verificação em cada nucleotídeo após sua adição. Essa atividade de nuclease permite a remoção pela enzima de um nucleotídeo adicionado recentemente e é altamente específica para pares de bases não correspondentes (**Figura 25-7**). Se a polimerase adicionou o nucleotídeo errado, a translocação da enzima para a posição onde o próximo nucleotídeo seria adicionado é inibida. Essa pausa cinética fornece a oportunidade para uma correção. A atividade da exonuclease de 3′→5′ remove o nucleotídeo malpareado, e a polimerase reinicia novamente. Essa atividade, conhecida como **revisão**, não é simplesmente o inverso da reação de polimerização (Equação 25-1), porque o pirofosfato não está envolvido. As atividades de polimerização e revisão de uma DNA-polimerase podem ser medidas separadamente. A revisão aperfeiçoa a precisão inerente da reação de polimerização em $10^2$ a $10^3$ vezes. Na DNA-polimerase I monomérica, as atividades de polimerização e revisão possuem sítios ativos separados no interior do mesmo polipeptídeo.

Quando a seleção de bases e a revisão são combinadas, a DNA-polimerase deixa para trás um erro resultante para cada $10^6$ a $10^8$ bases adicionadas. No entanto, a precisão medida em *E. coli* é ainda maior. A precisão adicional é fornecida por um sistema enzimático separado que repara o pareamento de bases malpareado (*mismatched*) que permaneceu após a replicação. Esse reparo de malpareamento (*mismatch*) é descrito, junto com outros processos de reparo do DNA, na Seção 25.2.

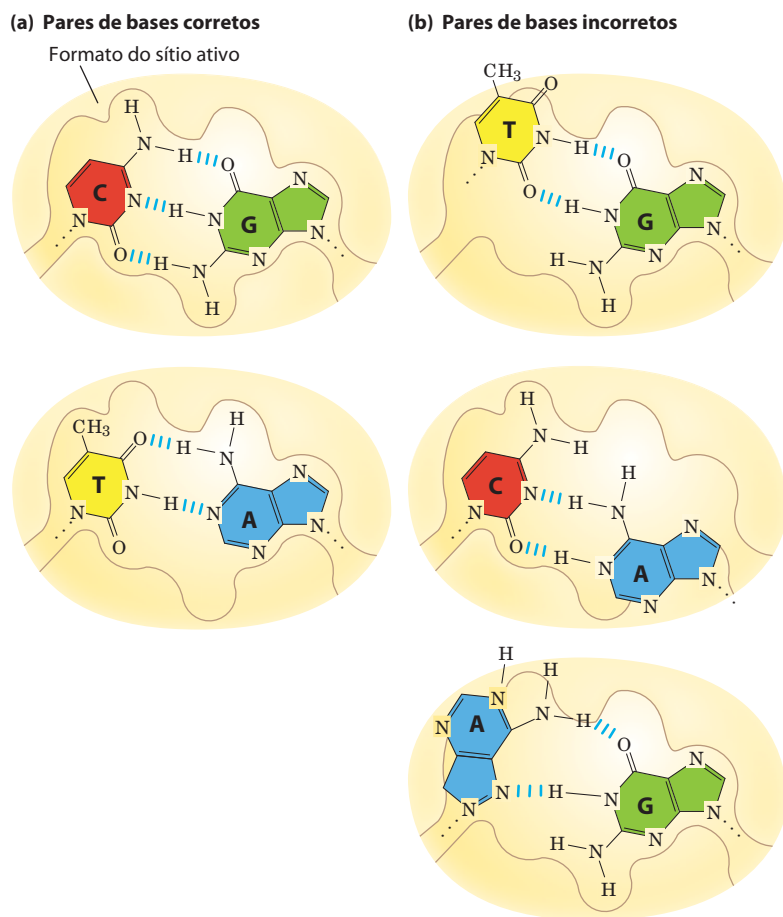



**FIGURA 25-6 Contribuição da geometria de pares de bases para a fidelidade da replicação do DNA. (a)** Os pares de bases padrão A═T e G≡C têm geometrias muito semelhantes, e um sítio ativo com tamanho adequado para acomodar um deles irá em geral acomodar o outro. **(b)** A geometria das bases pareadas incorretamente pode excluí-las do sítio ativo, como ocorre na DNA-polimerase.

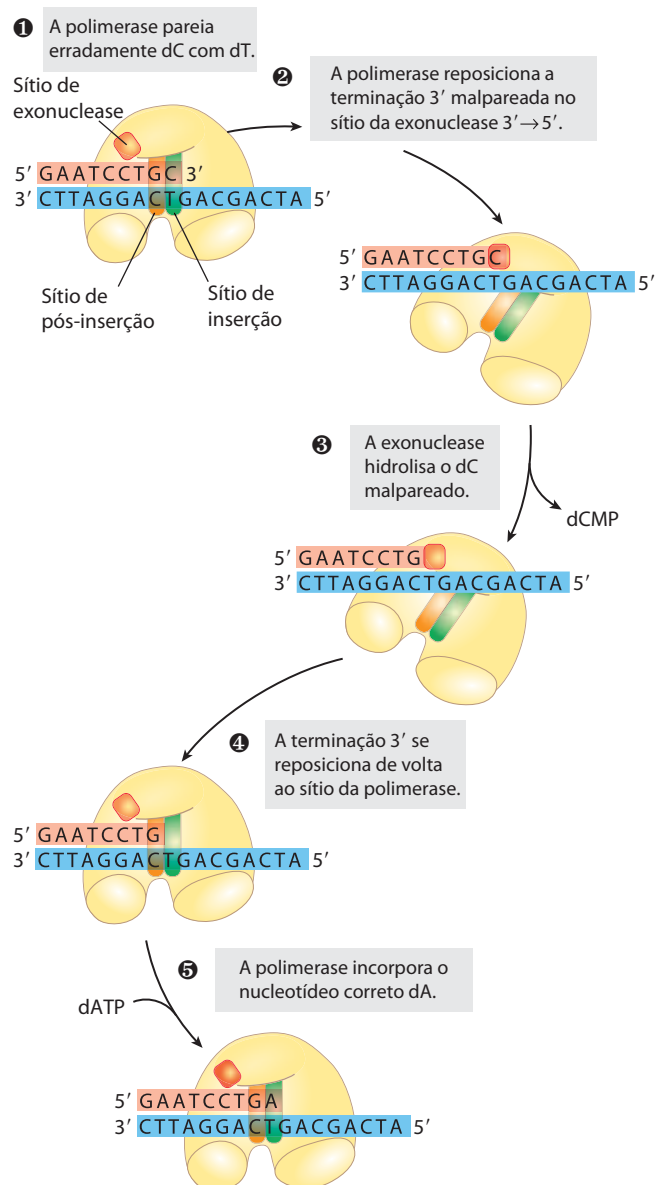



**FIGURA 25-7 Exemplo de correção de erro pela atividade de exonuclease 3′→5′ da DNA-polimerase I.** A análise estrutural localizou a atividade de exonuclease por trás da atividade de polimerase uma vez que a enzima é orientada em seu movimento ao longo do DNA. Uma base malpareada (aqui um pareamento errado C–T) impede a translocação da DNA-polimerase I para o próximo sítio. O DNA ligado à enzima desliza para trás para o sítio da exonuclease, e a enzima corrige o erro com sua atividade de exonuclease 3′→5′. A enzima então reassume sua atividade de polimerase na direção 5′→3′.

## A *E. coli* tem pelo menos cinco DNA-polimerases

Mais de 90% da atividade de DNA-polimerase observada em extratos de *E. coli* pode ser explicada pela DNA-polimerase I. Logo após o isolamento dessa enzima em 1955, entretanto, começaram a se acumular evidências de que ela não era adequada para o grande cromossomo de *E. coli*. Em primeiro lugar, a taxa com que ela adiciona nucleotídeos (600 nucleotídeos/min) é muito lenta (por um fator de 100 ou mais) para explicar a velocidade em que a forquilha de replicação se move na célula bacteriana. Em segundo lugar, a DNA-polimerase I tem uma processividade relativamente lenta. Em terceiro lugar, estudos genéticos demonstraram que muitos genes e, portanto, muitas proteínas, estão envolvidos na replicação: a DNA-polimerase I claramente não age sozinha. Em quarto lugar, e o mais importante, em 1969 John Cairns isolou uma linhagem bacteriana com um gene alterado para a DNA-polimerase I que produziu uma enzima inativa. Embora essa linhagem fosse anormalmente sensível aos agentes que danificaram seu DNA, ela era, entretanto, viável!

Uma busca por outras DNA-polimerases levou à descoberta da **DNA-polimerase II** e da **DNA-polimerase III** de *E. coli* no início da década de 1970. A DNA-polimerase II é uma enzima envolvida em um tipo de reparo do DNA (Seção 25.3). A DNA-polimerase III é a principal enzima de replicação em *E. coli*. As propriedades dessas três DNA-polimerases são comparadas na Tabela 25-1. As DNA-polimerases IV e V, identificadas em 1999, estão envolvidas em uma forma incomum de reparo do DNA (Seção 25.2).

**TABELA 25-1** Comparação de três DNA-polimerases de *E. coli*

| | DNA-polimerase | | |
|---|---|---|---|
| | I | II | III |
| Gene estrutural* | *polA* | *polB* | *polC (dnaE)* |
| Subunidades (número de tipos diferentes) | 1 | 7 | ≥10 |
| $M_r$ | 103.000 | 88.000[†] | 791.500 |
| Exonuclease 3′→5′ (revisão) | Sim | Sim | Sim |
| Exonuclease 5′→3′ | Sim | Não | Não |
| Taxa de polimerização (nucleotídeos/s) | 10-20 | 40 | 250-1.000 |
| Processividade (nucleotídeos adicionados antes que a polimerase se dissocie) | 3-200 | 1.500 | ≥500.000 |

*Para enzimas com mais de uma subunidade, o gene listado aqui codifica a subunidade com atividade de polimerização. Observe que *dnaE* é uma designação anterior para o gene agora chamado de *polC*.

[†]Apenas subunidade de polimerização. A DNA-polimerase II compartilha várias subunidades com a DNA-polimerase III, incluindo as subunidades $\beta$, $\gamma$, $\delta$, $\delta'$, $\chi$ e $\Psi$ (ver Tabela 25-2).

A DNA-polimerase I, portanto, não é a enzima principal da replicação; em vez disso, ela executa funções de limpeza durante a replicação, recombinação e reparo. As funções especiais das polimerases são potencializadas por sua atividade de exonuclease 5′→3′. Essa atividade, diferente da atividade de revisão da exonuclease 3′→5′ (Figura 25-7), está localizada em um domínio estrutural que pode ser separado da enzima por um tratamento com protease fraca. Quando o domínio de exonuclease 5′→3′ é removido, o fragmento remanescente ($M_r$ 68.000), o **fragmento grande** ou **fragmento de Klenow**, mantém as atividades de polimerização e revisão. A atividade de exonuclease 5′→3′ da DNA-polimerase I intacta pode substituir um segmento de DNA (ou RNA) pareado com a fita-molde, em um processo conhecido como tradução de corte (*nick translation*) (**Figura 25-8**). A maior parte das outras DNA-polimerases não tem a atividade de exonuclease 5′→3′.

A DNA-polimerase III é muito mais complexa do que a DNA-polimerase I (Tabela 25-2). Suas atividades de polimerização e revisão residem em suas subunidades $\alpha$ e $\varepsilon$ (epsilon), respectivamente. A subunidade $\theta$ se associa às subunidades $\alpha$ e $\varepsilon$ para formar uma polimerase central, a qual pode polimerizar o DNA, mas com processividade limitada. Duas polimerases centrais podem se ligar uma à outra por outro conjunto de subunidades, um complexo de carregamento de braçadeiras ou complexo $\gamma$, que consiste em cinco subunidades de quatro tipos diferentes $\tau_2\gamma\delta\delta'$. As polimerases centrais são ligadas por meio de subunidades $\tau$ (tau). Duas subunidades adicionais, $\chi$ (chi) e $\Psi$ (psi), são ligadas ao complexo carregador de braçadeiras. O conjunto completo de 13 subunidades de proteínas (nove tipos diferentes) é chamado de DNA-polimerase III* (**Figura 25-9a**).

A DNA-polimerase III* pode polimerizar o DNA, mas com uma processividade muito menor do que seria de esperar para a replicação organizada de um cromossomo inteiro. O aumento necessário na processividade é fornecido pela adição de subunidades $\beta$, quatro das quais completam a holoenzima da DNA-polimerase III. As subunidades $\beta$ se associam em pares para formar estruturas em forma de "rosquinhas" que circundam o DNA e atuam como braçadeiras (Figura 25-9b). Cada dímero se associa com um subconjunto central da polimerase III* (uma braçadeira dimérica para cada subconjunto central) e desliza ao longo do DNA à medida que a replicação prossegue. A braçadeira $\beta$ deslizante evita a dissociação da DNA-polimerase III do DNA, aumentando drasticamente a processividade – mais de 500.000 vezes (Tabela 25-1).

## A replicação do DNA precisa de muitas enzimas e fatores proteicos

A replicação em *E. coli* não precisa apenas de uma única DNA-polimerase, mas de 20 ou mais enzimas e proteínas diferentes, cada uma realizando uma tarefa específica. O complexo inteiro foi denominado de **sistema de DNA replicase** ou **replissomo**. A complexidade enzimática da replicação reflete as limitações impostas pela estrutura do DNA e pelas necessidades de precisão. As principais classes de enzimas de replicação são consideradas aqui em termos de problemas por elas superados.

O acesso às fitas de DNA que atuam como moldes requer a separação das duas fitas parentais. Isso geralmente é conseguido pelas **helicases**, enzimas que se deslocam ao longo do DNA e separam suas fitas, utilizando energia química a partir do ATP. A separação das fitas cria um estresse topológico na estrutura helicoidal do DNA (ver Figura 24-11), que é aliviado pela ação de **topoisomerases**. As fitas separadas são estabilizadas por **proteínas de ligação de DNA**. Como observado anteriormente, antes das DNA-polimerases poderem começar a sintetizar DNA, iniciadores devem estar presentes no molde – geralmente, pequenos segmentos de RNA sintetizados por

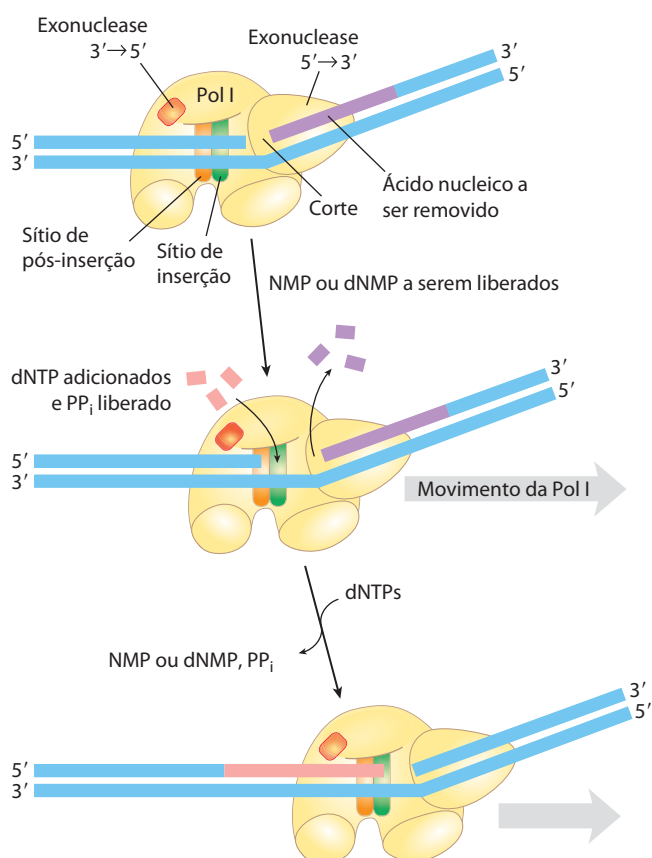



**FIGURA 25-8 Tradução de corte.** A DNA-polimerase I bacteriana tem três domínios, um domínio que atua como catalisador da DNA-polimerase, um domínio de atividade de exonuclease 5′→3′ e outro de atividade de exonuclease 3′→5′. O domínio de exonuclease 5′→3′ está na frente da enzima à medida que ela se desloca ao longo do DNA e não é mostrado na Figura 25-5. Ao degradar a fita de DNA à frente da enzima e sintetizar uma nova fita atrás, a DNA-polimerase I pode promover uma reação chamada de tradução de corte (*nick translation*) , em que uma quebra ou corte no DNA é efetivamente movida ao longo da molécula com a enzima. Esse processo tem um papel no reparo de DNA e na remoção dos iniciadores de RNA durante a replicação (ambos descritos posteriormente). A fita de ácido nucleico a ser removida (seja DNA ou RNA) é mostrada em roxo, a fita de substituição em vermelho. A síntese do DNA começa em um corte (uma ligação fosfodiéster quebrada, deixando uma hidroxila livre 3′ e um fosfato livre 5′). Um corte permanece onde a DNA-polimerase por fim se dissocia, sendo mais tarde selado por uma outra enzima.

**TABELA 25-2** Subunidades da DNA-polimerase III de *E. coli*

| Subunidade | Número de subunidades por holoenzima | $M_r$ da subunidade | Gene | Função da subunidade | |
|---|---|---|---|---|---|
| $\alpha$ | 2 | 129.900 | *polC (dnaE)* | Atividade de polimerização | Núcleo da polimerase |
| $\varepsilon$ | 2 | 27.500 | *dnaQ (mutD)* | Exonuclease de revisão 3′→5′ | |
| $\theta$ | 2 | 8.600 | *holE* | Estabilização da subunidade $\varepsilon$ | |
| $\tau$ | 2 | 71.100 | *dnaX* | Ligação ao molde estável; dimerização do núcleo enzimático | Complexo carregador de braçadeiras ($\gamma$) que carrega as subunidades $\beta$ na fita retardada em cada fragmento de Okazaki |
| $\gamma$ | 1 | 47.500 | *dnaX** | Carregadora de braçadeira | |
| $\delta$ | 1 | 38.700 | *holA* | Abridor de braçadeira | |
| $\delta'$ | 1 | 36.900 | *holB* | Carregadora de braçadeira | |
| $\chi$ | 1 | 16.600 | *holC* | Interação com SSB | |
| $\psi$ | 1 | 15.200 | *holD* | Interação com $\gamma$ e $\chi$ | |
| $\beta$ | 4 | 40.600 | *dnaN* | Grampo de DNA necessário para processividade ótima | |

*A subunidade $\gamma$ é codificada por uma porção do gene para a subunidade $\tau$, de modo que 66% da subunidade $\tau$, em sua porção amino terminal, tem a mesma sequência de aminoácidos que a subunidade $\gamma$. A subunidade $\gamma$ é produzida por um mecanismo de tradução por mudança de fase (p. 1111) que leva à terminação prematura da tradução.

enzimas conhecidas como **primases**. Em última análise, os iniciadores de RNA são removidos e substituídos por DNA; em *E. coli*, essa é uma das muitas funções da DNA-polimerase I. Após a remoção de um iniciador de RNA e do intervalo ser preenchido por DNA, permanece um corte (*nick*) no esqueleto de DNA na forma de uma ligação fosfodiéster rompida. Esses cortes são selados por **DNA-ligases**. Todos esses processos necessitam de coordenação e regulação, uma ação combinada mais bem caracterizada no sistema de *E. coli*.

**FIGURA 25-9 DNA-polimerase III. (a)** Arquitetura da DNA-polimerase III bacteriana (Pol III). Dois domínios centrais, compostos das subunidades $\alpha$, $\varepsilon$ e $\theta$, são ligados por um complexo carregador de braçadeiras de cinco subunidades (também conhecido como o complexo $\gamma$) com a composição de $\tau_2\gamma\delta\delta'$. As subunidades centrais e o complexo carregador de braçadeiras constituem a DNA-polimerase III*. As subunidades $\gamma$ e $\tau$ são codificadas pelo mesmo gene. A subunidade $\gamma$ é uma versão encurtada da subunidade $\tau$; esta unidade contém, portanto, um domínio idêntico ao da subunidade $\gamma$, junto com um segmento adicional que interage com a polimerase central. As duas outras subunidades da DNA-polimerase III*, $\chi$ e $\psi$ (não mostradas), também se ligam ao complexo carregador de braçadeiras. Duas $\beta$ braçadeiras interagem com as duas porções centrais do subarranjo, cada braçadeira um dímero da subunidade $\beta$. O complexo interage com a DnaB helicase (descrita mais tarde neste texto) pelas subunidades $\tau$. **(b)** As duas subunidades $\beta$ da polimerase III da *E. coli* formam uma braçadeira circular que envolve o DNA. A braçadeira desliza ao longo da molécula de DNA, aumentando a processividade da holoenzima da polimerase III para mais de 500.000 nucleotídeos ao impedir sua dissociação do DNA. As duas subunidades $\beta$ são mostradas em dois tons de roxo como estruturas em fita (esquerda) e imagens de superfície (direita), envolvendo o DNA (derivado da PDB ID 2POL).

**FIGURA 25-10 Arranjo das sequências na origem de replicação de *E. coli, oriC*.** São mostradas sequências consenso (p. 104) para elementos repetidos chave. N representa qualquer um dos quatro nucleotídeos. As setas horizontais indicam as orientações das sequências de nucleotídeos (seta da esquerda para a direita indica sequência na fita de cima; da esquerda para a direita, na fita de baixo). O FIS e o IHF são sítios de ligação para proteínas descritas no texto. Os sítios R são ligados pela DnaA. Os sítios I são sítios adicionais de ligação pela DnaA (com diferentes sequências), ligados pela DnaA apenas quando a proteína está complexada com ATP.

## A replicação do cromossomo de *E. coli* prossegue em estágios

A síntese de uma molécula de DNA pode ser dividida em três estágios: iniciação, alongamento e terminação, diferenciando-se tanto pelas reações que ocorrem como pelas enzimas necessárias. Como você descobrirá aqui e nos dois capítulos a seguir, a síntese dos principais polímeros biológicos que contêm informação – DNA, RNA e proteínas – pode ser compreendida com base nesses mesmos três estágios, com os estágios de cada via apresentando características peculiares. Os eventos descritos a seguir refletem a informação derivada principalmente de experimentos *in vitro* utilizando proteínas purificadas de *E. coli*, embora os princípios sejam altamente conservados em todos os sistemas de replicação.

**Iniciação** A origem da replicação de *E. coli*, *oriC*, consiste em 245 pb e contém elementos sequenciais de DNA que são altamente conservados entre origens de replicação bacteriana. O arranjo geral das sequências conservadas é ilustrado na **Figura 25-10**. Dois tipos de sequências apresentam especial interesse: cinco repetições de uma sequência de 9 pb (sítios R) que funcionam como sítios de ligação para a proteína iniciadora chave DnaA, e uma região rica em pares de bases A═T chamada de **elemento de desenrolamento de DNA** (**DUE**). Há três sítios de ligação de DnaA (sítios I), e sítios de ligação para proteínas IHF (fator de integração do hospedeiro) e FIS (fator para estimulação de inversão). Essas duas proteínas foram descobertas como componentes necessários de algumas reações de recombinação descritas adiante neste capítulo, e seus nomes refletem esses papéis. Outra proteína de ligação de DNA, a HU (proteína bacteriana semelhante à histona, originalmente denominada de fator U), também participa, mas não tem um sítio de ligação específico.

Pelo menos 10 enzimas ou proteínas diferentes (resumidas na Tabela 25-3) participam da fase de iniciação da replicação. Elas abrem a hélice do DNA na origem e estabelecem um complexo de pré-iniciação para reações subsequentes. O componente crucial no processo de iniciação é a proteína DnaA, um membro da família de proteínas **AAA+ ATPase**

**TABELA 25-3** Proteínas necessárias para iniciar a replicação na origem de *E. coli*

| Proteína | $M_r$ | Número de subunidades | Função |
|---|---|---|---|
| Proteína DnaA | 52.000 | 1 | Reconhece a sequência ori; abre o duplex em sítios específicos na origem |
| Proteína DnaB (helicase) | 300.000 | 6* | Desenrola o DNA |
| Proteína DnaC | 174.000 | 6* | Necessária para a ligação da DnaB na origem |
| HU | 19.000 | 2 | Proteína semelhante à histona; proteína de ligação do DNA; estimula a iniciação |
| FIS | 22.500 | 2* | Proteína de ligação do DNA; estimula a iniciação |
| IHF | 22.000 | 2 | Proteína de ligação do DNA; estimula a iniciação |
| Primase (proteína DnaG) | 60.000 | 1 | Sintetiza iniciadores de RNA |
| Proteína de ligação ao DNA de fita simples (SSB) | 75.600 | 4* | Liga-se ao DNA de fita simples |
| DNA girase (DNA-topoisomerase II) | 400.000 | 4 | Alivia a tensão de torção gerada pelo desenrolamento do DNA |
| Dam metilase | 32.000 | 1 | Metila as sequências (5′)GATC em *ori*C |

*As subunidades nesses casos são idênticas.

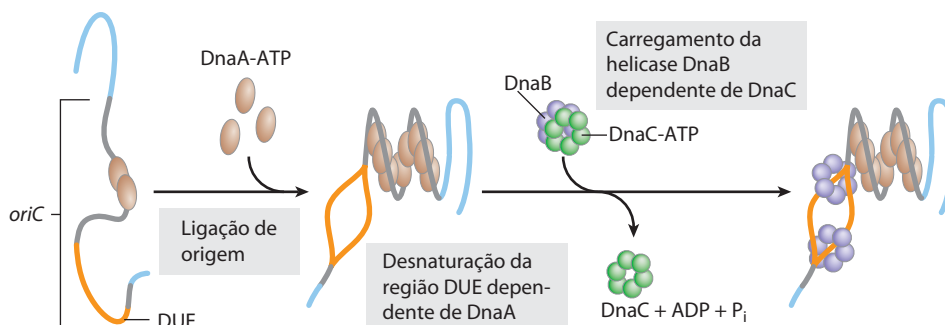



**FIGURA 25-11 Modelo para iniciação da replicação na origem de *E. coli, oriC*.** Oito moléculas da proteína DnaA, cada uma com um ATP ligado, ligam-se nos sítios R e I na origem (ver Figura 25-10). O DNA está enrolado em volta deste complexo, formando uma estrutura helicoidal virada para direita. A região DUE rica em A=T é desnaturada como resultado da tensão deferida pela ligação adjacente da DnaA. A formação do complexo DnaA helicoidal é facilitada pelas proteínas HU, IHF e FIS, que não são mostradas porque seus papéis estruturais detalhados ainda não foram definidos. Hexâmeros da proteína DnaB se ligam a cada fita, com o auxílio da proteína DnaC. A atividade da helicase da DnaB ainda desenrola o DNA na preparação para a síntese do iniciador e do DNA.

(*A*TPases associadas a diversas atividades celulares). Muitas AAA+ ATPases, incluindo a DnaA, formam oligômeros e hidrolisam ATP com relativa lentidão. Essa hidrólise do ATP atua como um interruptor mediando a interconversão da proteína entre dois estados. No caso da DnaA, a forma ligada ao ATP é ativa e a forma ligada ao ADP é inativa.

Oito moléculas de proteína DnaA, todas no estado de ligadas ao ATP, se reúnem para formar um complexo helicoidal abrangendo os sítios R e I no *oriC* (**Figura 25-11**). A DnaA tem maior afinidade pelos sítios R do que pelos sítios I e se liga aos sítios R com igual facilidade tanto na forma ligada ao ATP quanto na ligada ao ADP. Os sítios I, os quais ligam apenas à DnaA ligada ao ATP, permitem a diferenciação entre as formas ativas e inativas de DnaA. O enrolamento estreito do DNA para a direita em volta desse complexo introduz um eficaz superespiralamento positivo (ver Capítulo 24). A tensão associada no DNA vizinho leva à desnaturação na região DUE, rica em A═T. O complexo formado na origem de replicação também inclui várias proteínas de ligação de DNA – HU, IHF e FIS – que facilitam o enovelamento do DNA.

A proteína DnaC, outra AAA+ ATPase, carrega então a proteína DnaB para as fitas de DNA separadas na região desnaturada. Um hexâmero de DnaC, com cada subunidade ligada ao ATP, forma um complexo estreito com a helicase DnaB hexamérica em forma de anel. Essa interação DnaC-DnaB abre o anel de DnaB, em um processo auxiliado por uma interação adicional entre a DnaB e a DnaA. Dois hexâmeros de DnaB em forma de anel são carregados no DUE, cada um em uma fita de DNA. O ATP ligado à DnaC é hidrolisado, liberando a DnaC e deixando a DnaB ligada ao DNA.

O carregamento da helicase DnaB é a etapa-chave na iniciação da replicação. Como uma helicase replicativa, a DnaB migra ao longo da fita simples de DNA na direção 5′→3′, desenrolando o DNA ao longo do caminho. As helicases DnaB carregadas nas duas fitas de DNA viajam em direções opostas, criando duas forquilhas de replicação potenciais. Todas as outras proteínas na forquilha de replicação são ligadas direta ou indiretamente à DnaB. A holoenzima de DNA-polimerase III é ligada por meio de subunidades $\tau$; interações adicionais de DnaB são descritas a seguir. À medida que a replicação começa e as fitas de DNA são separadas na forquilha, muitas moléculas de proteínas de ligação de DNA de fita simples (SSB) se ligam e estabilizam as fitas separadas, e a DNA-girase (DNA-topoisomerase II) alivia o estresse topológico induzido à frente da forquilha pela reação de desenrolamento.

A iniciação é a única fase da replicação do DNA que é conhecida por ser regulada, e ela é regulada de modo que a replicação ocorra apenas uma vez em cada ciclo celular. O mecanismo de regulação ainda não é completamente compreendido, mas estudos genéticos e bioquímicos forneceram ideias sobre vários mecanismos regulatórios distintos.

Uma vez que a DNA-polimerase III tenha sido carregada na direção do DNA, em conjunto com as subunidades $\beta$ (sinalizando a finalização da fase de iniciação), a proteína Hda se liga às subunidades $\beta$ e interage com a DnaA para estimular a hidrólise de seu ATP ligado. A Hda é mais outra AAA+ ATPase intimamente relacionada à DnaA (seu nome é derivado de *h*omólogo à *DnaA*). Essa hidrólise do ATP leva à desmontagem do complexo de DnaA na origem. A liberação lenta do ADP pela DnaA e a religação do ATP faz a proteína circular entre suas formas inativa (ligada a ADP) e ativa (ligada a ATP) em uma escala de tempo de 20 a 40 minutos.

O tempo de iniciação da replicação é afetado pela metilação do DNA e pelas interações com a membrana plasmática bacteriana. O DNA *oriC* é metilado pela *Dam* metilase (Tabela 25-3), a qual metila a posição $N^6$ da adenina no interior da sequência palindrômica GATC(5′) (*Dam* significa metilação da adenina do DNA – do inglês *DNA adenine methylation*). A região *oriC* de *E. coli* é muito rica em sequências GATC – ela possui 11 delas em seus 245 pb, ao passo que a frequência média de GATC no cromossomo de *E. coli* , como um todo, é de 1 em cada 256 pb.

Imediatamente após a replicação, o DNA é hemimetilado: as fitas parentais têm sequências *oriC* metiladas, mas as fitas recentemente sintetizadas não. As sequências *oriC* hemimetiladas são agora sequestradas pela interação com a membrana plasmática (o mecanismo é desconhecido) e pela ligação da proteína SeqA. Após um tempo, a *oriC* é

liberada da membrana plasmática, se dissocia de SeqA e o DNA deve estar totalmente metilado pela *Dam* metilase antes que ele possa novamente se ligar à DnaA e iniciar um novo ciclo de replicação.

**Alongamento** A fase de alongamento da replicação inclui duas operações distintas, porém relacionadas: a síntese da fita líder e a síntese da fita retardada. Várias enzimas na forquilha de replicação são importantes para a síntese de ambas as fitas. O DNA parental é inicialmente desenrolado pelas DNA-helicases, e o resultante estresse topológico é aliviado pelas topoisomerases. Cada fita separada é, então, estabilizada pela SSB. A partir desse ponto, a síntese das fitas líder e retardada é completamente diferente.

A síntese da fita líder, a mais direta das duas, começa com a síntese pela primase (proteína DnaG) de um iniciador curto de RNA (10 a 60 nucleotídeos) na origem de replicação. A DnaG interage com a helicase DnaB para realizar essa reação, e o iniciador é sintetizado na direção oposta àquela em que a helicase DnaB está se movendo. Com efeito, a helicase DnaB se move ao longo da fita que se torna a fita retardada na síntese do DNA; entretanto, o primeiro iniciador formado na primeira interação DnaG-DnaB funciona como iniciador da síntese da fita líder de DNA na direção oposta. Desoxirribonucleotídeos são adicionados a esse iniciador por um complexo DNA-polimerase III ligado à helicase DnaB presa à fita de DNA oposta. A síntese da fita líder prossegue então continuamente, acompanhando o desenrolamento do DNA na forquilha de replicação.

A síntese da fita retardada, como já foi observado, é realizada em fragmentos curtos de Okazaki (**Figura 25-12a**). Inicialmente, um iniciador de RNA é sintetizado pela primase e, como na síntese da fita líder, a DNA-polimerase III se liga ao iniciador de RNA e adiciona desoxirribonucleotídeos (Figura 25-12b). Nesse nível, a síntese de cada fragmento de Okazaki parece ser direta, mas a realidade é muito complexa. A complexidade reside na *coordenação* da síntese das fitas líder e retardada. Ambas as fitas são produzidas por um *único* dímero assimétrico de DNA-polimerase III; isso é conseguido fazendo uma volta na fita retardada de DNA, como mostrado na **Figura 25-13**, que coloca juntos os dois pontos de polimerização.

A síntese dos fragmentos de Okazaki na fita retardada implica uma coreografia enzimática elegante. A helicase DnaB e a primase DnaG constituem uma unidade funcional no interior do complexo de replicação, o **primossomo**. A DNA-polimerase III utiliza um conjunto de suas subunidades centrais (a polimerase central) para sintetizar a fita líder continuamente, enquanto o outro conjunto de subunidades centrais realiza o ciclo de um fragmento de Okazaki para o próximo na fita retardada em alça. A helicase DnaB, ligada na frente da DNA-polimerase III, desenrola o DNA

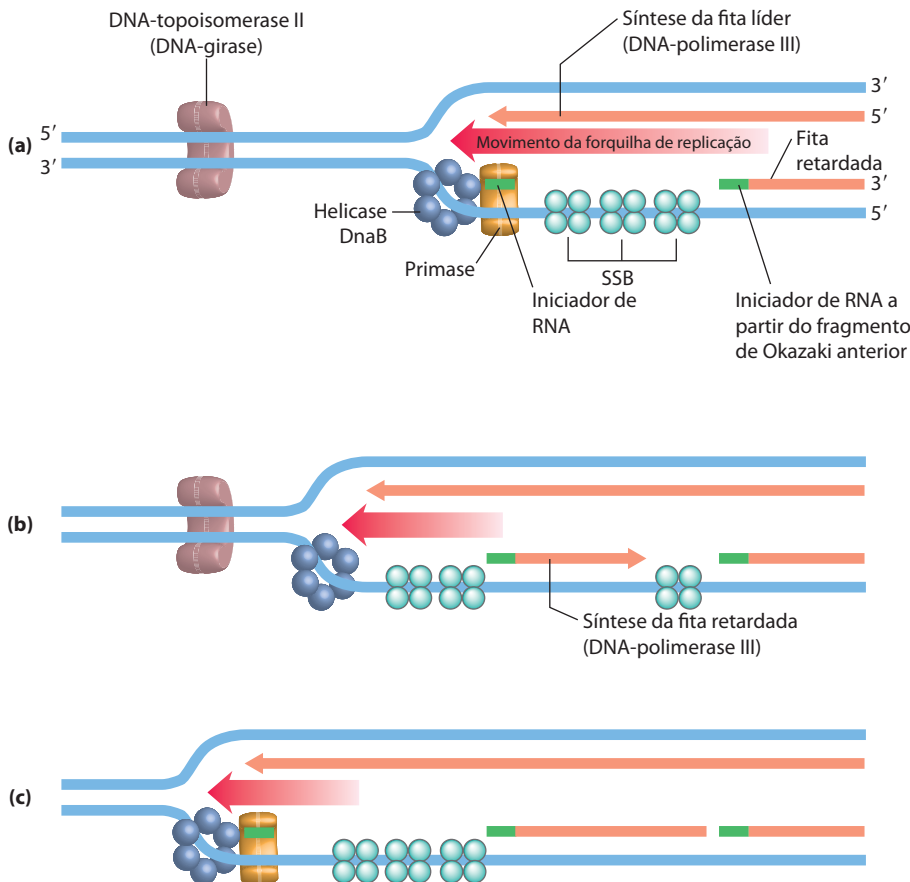



**FIGURA 25-12 Síntese dos fragmentos de Okazaki.** **(a)** A primase sintetiza, em intervalos, um iniciador de RNA para um novo fragmento de Okazaki. Observe que ao se considerar as duas fitas-molde dispostas lado a lado, a síntese da fita retardada formalmente prossegue na direção oposta do movimento da forquilha. **(b)** Cada iniciador é estendido pela DNA-polimerase III. **(c)** A síntese do DNA continua até que o fragmento se estenda tão longe quanto o iniciador do fragmento de Okazaki previamente adicionado. Um novo iniciador é sintetizado próximo da forquilha de replicação para começar o processo novamente.

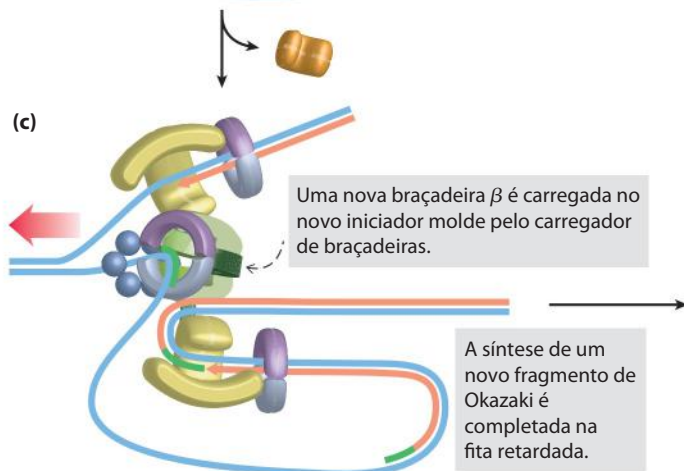
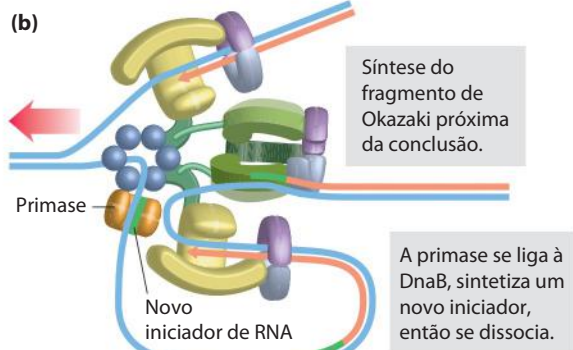
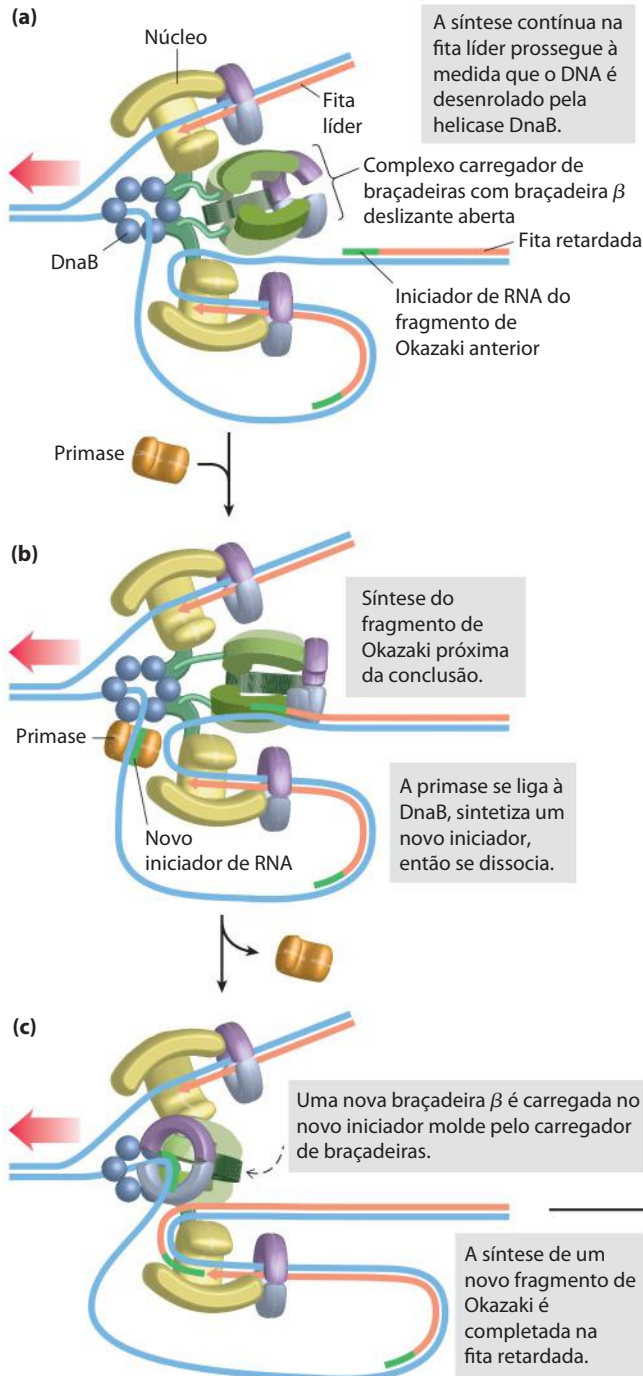



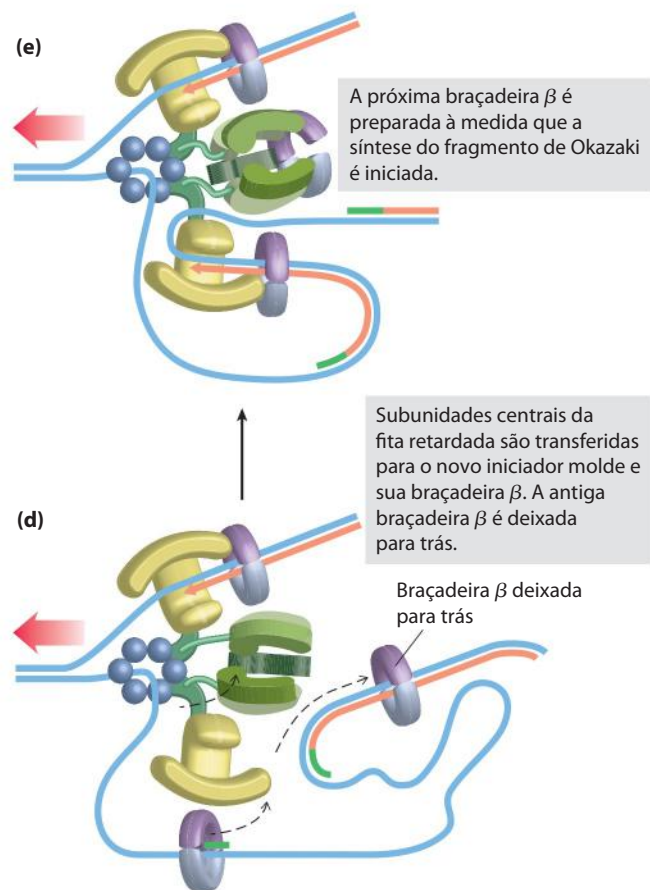
**FIGURA 25-13 Síntese do DNA nas fitas líder e retardada.** Os eventos na forquilha de replicação são coordenados por um dímero de uma única DNA-polimerase III, em um complexo integrado com a helicase DnaB. Essa figura mostra o processo de replicação ainda em curso (partes **(a)** até **(e)** são discutidas no texto). A fita retardada sofre uma volta de modo que a síntese de DNA prossegue constantemente tanto na fita-molde líder quanto na retardada ao mesmo tempo. As setas vermelhas indicam a extremidade 3′ das duas novas fitas e a direção da síntese de DNA. As setas pretas fortes mostram a direção do movimento do DNA parental pelo complexo. Um fragmento de Okazaki está sendo sintetizado na fita retardada. As cores das subunidades e as funções do complexo carregador de braçadeiras são explicadas na Figura 25-14. **Síntese de DNA**

na forquilha de replicação (Figura 25-13a) à medida que ele viaja ao longo do molde da fita retardada na direção 5′→3′. A primase DnaG ocasionalmente se associa à helicase DnaB e sintetiza um iniciador de RNA curto (Figura 25-13b). Uma nova braçadeira β deslizante é, então, posicionada no iniciador pelo complexo carregador de braçadeiras da DNA-polimerase III (Figura 25-13c). Quando a síntese de um fragmento de Okazaki se completa, a replicação para e as subunidades centrais de DNA-polimerase III se dissociam de sua braçadeira β deslizante (e do fragmento completo de Okazaki) e se associam à nova braçadeira (Figura 25-13d, e). Isso inicia a síntese de um novo fragmento de Okazaki. Como observado anteriormente, o complexo inteiro responsável pela síntese coordenada de DNA na forquilha de replicação é conhecido como replissomo. As proteínas que atuam na forquilha de replicação são resumidas na Tabela 25-4.

**TABELA 25-4** Proteínas do replissomo de *E. coli*

| Proteína | $M_r$ | Número de subunidades | Função |
|---|---|---|---|
| SSB | 75.600 | 4 | Ligação a um DNA de fita única |
| Proteína DnaB (helicase) | 300.000 | 6 | Desenrolamento do DNA, constituinte do primossomo |
| Primase (proteína DnaG) | 60.000 | 1 | Síntese do iniciador de RNA; constituinte do primossomo |
| DNA-polimerase III | 791.500 | 17 | Novo alongamento da fita |
| DNA-polimerase I | 103.000 | 1 | Preenchimento dos intervalos; excisão dos iniciadores |
| DNA-ligase | 74.000 | 1 | Ligação |
| DNA-girase (DNA-topoisomerase II) | 400.000 | 4 | Superenrolamento |

Fonte: Modificada de Kornberg, A. (1982) *Supplement to DNA replication*, Tabela S11-2, W.H. Freeman and Company, New York.

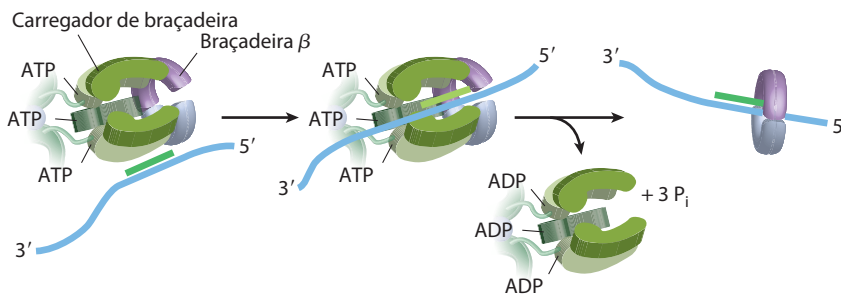



**FIGURA 25-14 Carregador de braçadeiras da DNA-polimerase III.** As cinco subunidades do complexo carregador de braçadeiras são as subunidades $\gamma$, $\delta$ e $\delta'$ e o domínio aminoterminal de cada subunidade $\tau$ (ver Figura 25-9). O complexo se liga a três moléculas de ATP e a uma braçadeira dimérica $\beta$. Esta ligação força a braçadeira $\beta$ a se abrir em uma das suas duas interfaces de subunidade. A hidrólise do ATP ligado permite que a braçadeira $\beta$ se feche de novo em torno do DNA.

O complexo de carregamento de braçadeira da DNA-polimerase III, que consiste em partes de duas subunidades $\beta$ ao longo das subunidades $\gamma$, $\delta$ e $\delta'$, também é uma AAA+ ATPase. Esse complexo se liga ao ATP e à nova braçadeira $\beta$ deslizante. A ligação confere tensão à braçadeira dimérica, abrindo o anel em uma subunidade da interface (**Figura 25-14**). A fita retardada que acabou de sofrer *priming* desliza para o interior do anel pela quebra resultante. O carregador de braçadeiras, então, hidrolisa o ATP liberando a braçadeira $\beta$ deslizante e permitindo que ela se feche em volta do DNA.

O replissomo promove a rápida síntese do DNA, adicionando aproximadamente 1.000 nucleotídeos/s para cada fita (líder ou retardada). Uma vez que um fragmento de Okazaki tenha se completado, seu iniciador de RNA é removido e substituído por DNA pela DNA-polimerase I e o corte (*nick*) remanescente selado pela DNA-ligase (**Figura 25-15**).

A DNA-ligase catalisa a formação de uma ligação fosfodiéster entre 3′-hidroxila na extremidade de uma fita de DNA e 5′-fosfato na extremidade da outra fita. O fosfato deve ser ativado por adenilação. As DNA-ligases isoladas de vírus e eucariontes utilizam ATP para esse propósito. As DNA-ligases de bactérias são incomuns pelo fato de muitas usarem $NAD^+$ – cofator que geralmente funciona em reações de transferência de híbridos (ver Figura 13-24) – como a fonte do grupo de ativação de AMP (**Figura 25-16**). A DNA-ligase é outra enzima do metabolismo de DNA que se tornou um importante reagente em experimentos de DNA recombinante (ver Figura 9-1).

**Terminação** Por fim, as duas forquilhas de replicação do cromossomo circular de *E. coli* se encontram em uma região terminal que contém cópias múltiplas de uma sequência de 20 pb denominada Ter (**Figura 25-17**). As sequências Ter são arrumadas no cromossomo para criar

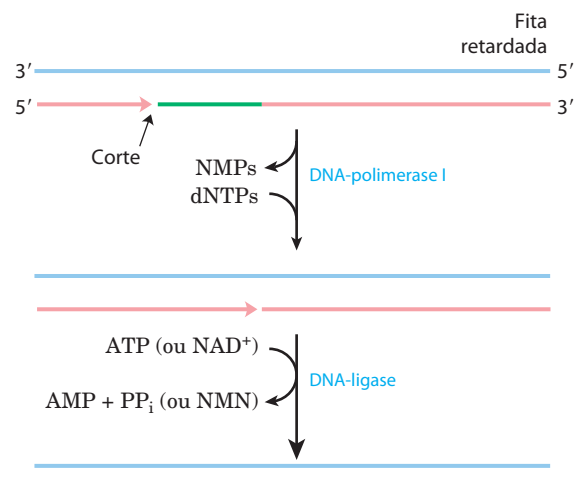



**FIGURA 25-15 Etapas finais na síntese dos segmentos da fita retardada.** Os iniciadores de RNA na fita retardada são removidos pela atividade de exonuclease 5′→3′ da DNA-polimerase I e são substituídos por DNA pela mesma enzima. O corte remanescente é selado pela DNA-ligase. O papel do ATP ou $NAD^+$ é mostrado na Figura 25-16.

Enzima—$NH_3^+$
DNA-ligase
❶ Adenililação da DNA-ligase
R—O—P—O—Ribose—Adenina
AMP do ATP (R = $PP_i$) ou $NAD^+$ (R = NMN)
$PP_i$ (do ATP) ou NMN (do $NAD^+$)
Enzima—$\overset{+}{N}H_2$—P—O—Ribose—Adenina
Enzima-AMP
❷ Ativação do 5′-fosfato no corte
3′ 5′
5′ OH 3′
Corte no DNA
Enzima—$NH_3^+$
❸ Deslocamento do AMP sela o corte
$^-$O—P—O—Ribose—Adenina
AMP
DNA-ligase
DNA selado

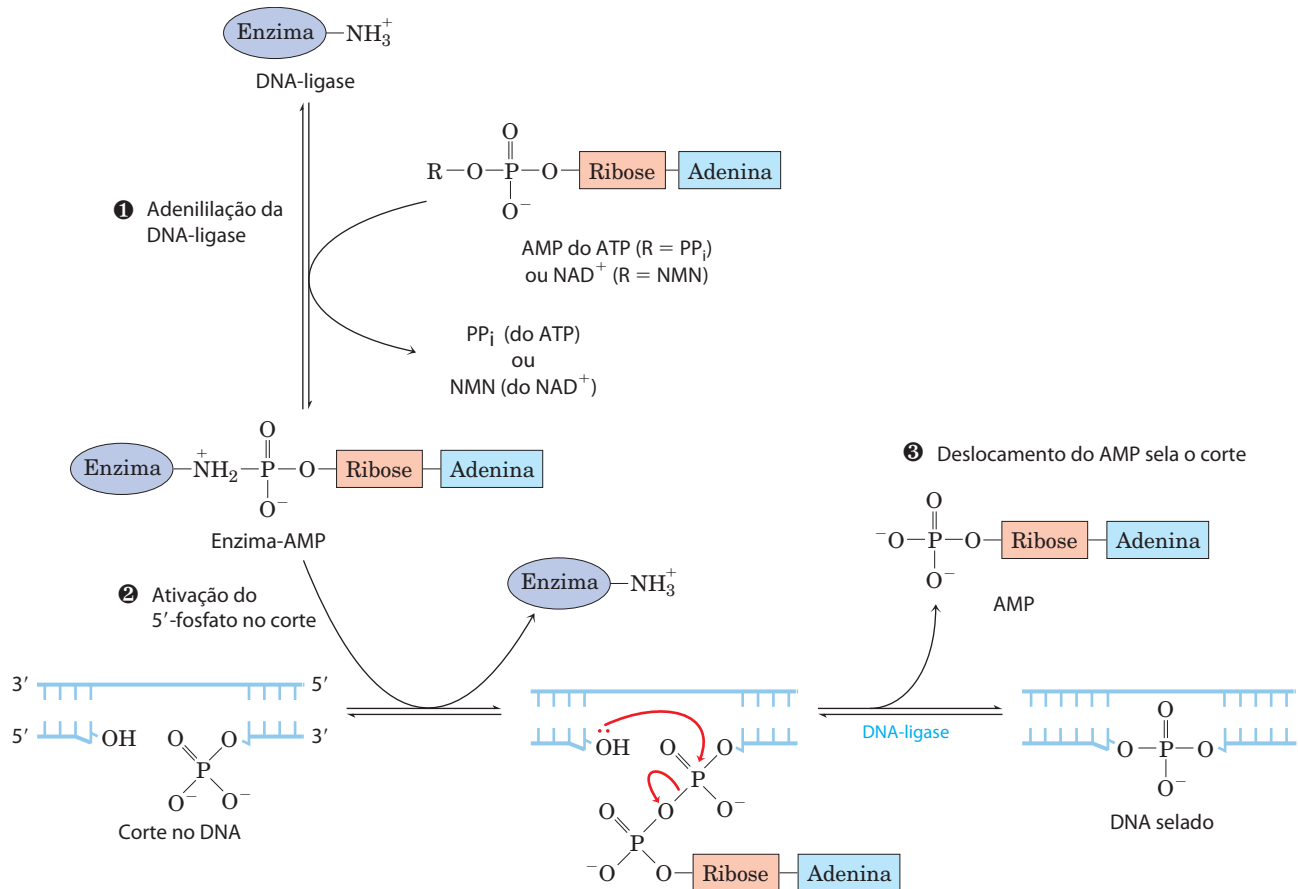



**FIGURA 25-16 Mecanismo de reação da DNA-ligase.** Em cada uma das três etapas, uma ligação fosfodiéster é formada à custa de outra. As etapas ❶ e ❷ levam à ativação do 5′ fosfato no corte. Um grupo AMP é transferido primeiro para um resíduo Lys na enzima e então para o fosfato 5′ no corte. Na etapa ❸, o grupo 3′-hidroxila ataca esse fosfato e desloca o AMP, produzindo uma ligação fosfodiéster para selar o corte. Na reação da DNA-ligase em *E. coli*, o AMP é derivado do $NAD^+$. As DNA-ligases isoladas de algumas fontes virais e eucarióticas usam ATP em vez de $NAD^+$ e liberam pirofosfato em vez de nicotinamida mononucleotídeo (NMN) na etapa ❶.

uma armadilha na qual a forquilha de replicação possa entrar, mas não sair. As sequências Ter funcionam como sítios de ligação para a proteína Tus (substância de utilização de terminal). O complexo Tus-Ter pode sequestrar uma forquilha de replicação a partir de apenas uma direção. Apenas um complexo Tus-Ter funciona por ciclo de replicação – o primeiro complexo encontrado por qualquer forquilha de replicação. Uma vez que as forquilhas de replicação opostas geralmente param quando colidem, as sequências Ter não parecem ser essenciais, mas elas podem evitar o excesso de replicação por uma forquilha no evento no qual a outra está atrasada ou interrompida por um encontro com um dano no DNA ou algum outro obstáculo.

**FIGURA 25-17 Terminação da replicação de cromossomos em *E. coli*.** As sequências Ter (*TerA* a *TerJ*) são posicionadas no cromossomo em dois grupos com orientações opostas.

Assim, quando qualquer uma das forquilhas de replicação encontra um complexo Tus-Ter funcional, ela para; a outra forquilha para quando encontra a primeira forquilha (presa). As poucas centenas finais de pares de bases de DNA entre esses grandes complexos proteicos são, então, replicados (por um mecanismo ainda desconhecido), completando dois cromossomos circulares topologicamente interligados (catenados) (**Figura 25-18**). Os círculos de DNA ligados desse modo são conhecidos como **catenanos**. A separação desses círculos catenados em *E. coli* precisa da topoisomerase IV (topoisomerase

**FIGURA 25-18 Papel das topoisomerases na terminação da replicação.** A replicação do DNA separando forquilhas de replicação opostas deixa os cromossomos concluídos unidos como catenanos, ou como círculos topologicamente interligados. Os círculos não são ligados covalentemente, mas como eles estão entrelaçados e cada um é covalentemente fechado, eles não podem ser separados – exceto pela ação das topoisomerases. Em *E. coli*, uma topoisomerase de tipo II conhecida como DNA-topoisomerase IV desempenha o papel principal na separação dos cromossomos catenados, transitoriamente quebrando ambas as fitas de DNA de um cromossomo e permitindo que o outro cromossomo passe pela quebra.

de tipo II). Os cromossomos separados então se segregam em células-filhas na divisão celular. A fase terminal da replicação de outros cromossomos circulares, incluindo muitos dos vírus de DNA que infectam células de eucariontes, é semelhante.

## A replicação em células eucarióticas é semelhante, porém mais complexa

As moléculas de DNA nas células eucariontes são consideravelmente maiores do que aquelas nas bactérias e são organizadas em estruturas de nucleoproteínas complexas (cromatina; p. 994). As características essenciais da replicação do DNA são as mesmas em eucariontes e bactérias, e muitos dos complexos proteicos são conservados funcionalmente e estruturalmente. Entretanto, a replicação eucariótica é regulada e coordenada com o ciclo celular, introduzindo algumas complexidades adicionais.

As origens de replicação têm uma estrutura bem caracterizada em alguns eucariontes inferiores, mas são muito menos conhecidas em eucariontes superiores. Em vertebrados, várias sequências ricas em A═T podem ser utilizadas para a iniciação da replicação, e os sítios podem variar de uma divisão celular para outra. A levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) tem origens de replicação definidas, denominadas sequências de replicação autônomas (ARS), ou **replicadores**. Os replicadores de leveduras se estendem por aproximadamente 150 pb e contêm várias sequências conservadas essenciais. Cerca de 400 replicadores estão distribuídos entre 16 cromossomos de um genoma haploide de levedura.

A regulação garante que todo DNA celular seja replicado uma vez por ciclo celular. A maior parte dessa regulação envolve proteínas denominadas ciclinas e cinases dependentes de ciclina (CDK) com as quais elas formam complexos (p. 484). As ciclinas são rapidamente destruídas pela proteólise dependente de ubiquitina no final da fase M (mitose) e a ausência de ciclinas permite o estabelecimento de **complexos pré-replicativos** (**pré-RC**) nos sítios de iniciação de replicação. Em células de crescimento rápido, o pré-RC se forma no final da fase M. Em células de crescimento lento, ele não se forma até o final de G1. A formação do pré-RC confere à célula competência para replicação, um evento algumas vezes chamado de **licenciamento**.

Tal como em bactérias, o evento-chave na iniciação da replicação em todos os eucariontes é o carregamento da helicase replicativa, um complexo hetero-hexamérico de **proteínas de manutenção de minicromossomos** (**MCM**) (MCM2 a MCM7). A helicase anelar MCM2–7, que funciona como a helicase DnaB bacteriana, é carregada no DNA por outro complexo de seis proteínas denominado **ORC** (**complexo de reconhecimento de origem**) (**Figura 25-19**). O ORC tem cinco domínios AAA+ ATPase entre suas subunidades e é funcionalmente análogo à DnaA bacteriana. Duas outras proteínas, CDC6 (*c*iclo de *d*ivisão *c*elular) e CDT1 (*C*DC10 *d*ependente do *t*ranscrito *1*), também são necessárias para carregar o complexo MCM2-7, e o CDC6 de levedura é outra AAA+ ATPase.

O compromisso com a replicação precisa da síntese e atividade dos complexos ciclina-CDK da fase S (como o complexo ciclina E-CDK2; ver Figura 12-46) e CDC7-DBF4. Ambos os tipos de complexos auxiliam a ativar a replicação ligando-se a várias proteínas e as fosforilando no pré-RC. Outras ciclinas e CDK funcionam para inibir a formação de mais complexos pré-RC, uma vez que a replicação tenha se iniciado. Por exemplo, o CDK2 se liga à ciclina A à medida que os níveis de ciclina E diminuem durante a fase S, inibindo o CDK2 e impedindo o licenciamento de complexos pré-RC adicionais.

A velocidade de movimentação da forquilha de replicação em eucariontes (~50 nucleotídeos/s) é apenas um vigésimo daquela observada em *E. coli*. Nessa velocidade, a replicação de um cromossomo humano médio a partir de

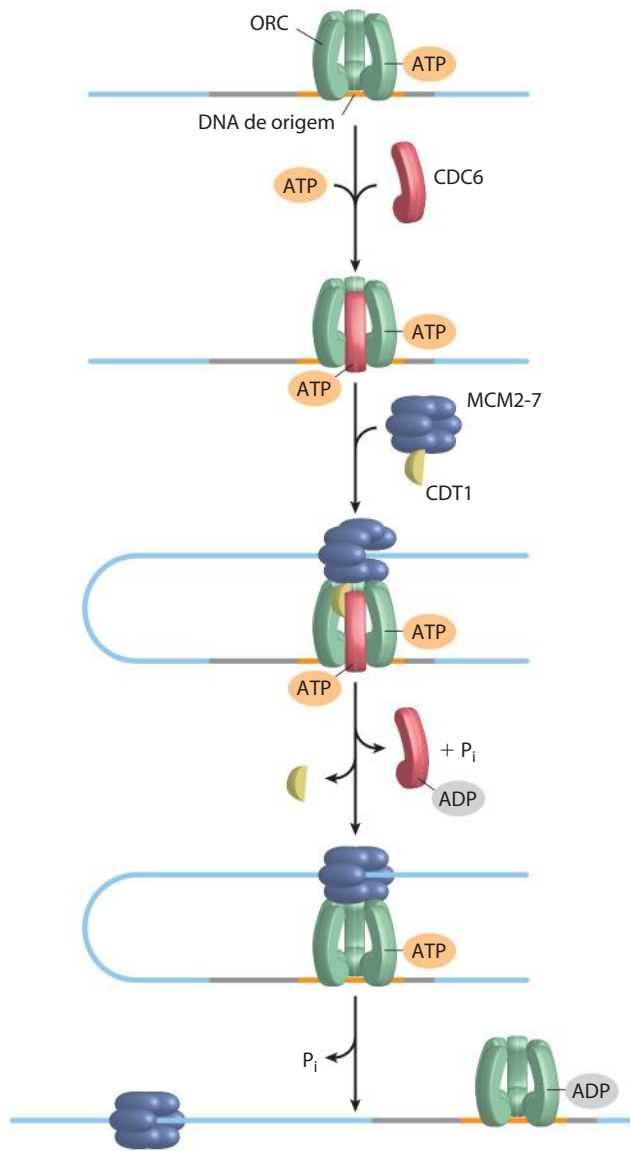



**FIGURA 25-19 Montagem de um complexo pré-replicativo em uma origem de replicação eucariótica.** O sítio de iniciação (origem) é ligado por ORC, CDC6 e CDT1. Estas proteínas, muitas das quais AAA+ ATPases, promovem o carregamento da helicase replicativa, MCM2-7, em uma reação análoga ao carregamento da helicase DnaB bacteriana pela proteína DnaC. O carregamento do complexo helicase MCM para o DNA forma o complexo pré-replicativo, ou pré-RC, e é a etapa-chave na iniciação da replicação.

uma única origem levaria mais de 500 horas. A replicação de cromossomos humanos, de fato, segue bidirecionalmente a partir de várias origens, espaçadas de 30 a 300 kpb. Cromossomos eucariontes são quase sempre bem maiores que cromossomos bacterianos, de modo que origens múltiplas são provavelmente uma característica universal de células eucariontes.

Assim como as bactérias, os eucariontes têm vários tipos de DNA-polimerases. Algumas foram associadas a funções específicas, como a replicação do DNA mitocondrial. A replicação de cromossomos nucleares envolve a DNA-polimerase $\alpha$, em associação com a DNA-polimerase $\delta$. A **DNA-polimerase $\alpha$** é geralmente uma enzima de multissubunidades com estrutura e propriedades semelhantes em todas as células eucariontes. Uma subunidade tem atividade de primase, e a maior subunidade ($M_r \sim$ 180.000) contém atividade de polimerização. Entretanto, essa polimerase não tem atividade de revisão da exonuclease $3'\rightarrow5'$, tornando-a inadequada para a replicação de DNA de alta fidelidade. Acredita-se que a DNA-polimerase $\alpha$ funcione apenas na síntese de iniciadores curtos (tanto RNA quanto DNA) para fragmentos de Okazaki na fita retardada. Esses iniciadores são, então, estendidos pela **DNA-polimerase $\delta$** de multissubunidades. Essa enzima está associada ao antígeno nuclear de proliferação celular e é por ele estimulada (PCNA; $M_r$ 29.000), uma proteína encontrada em grandes quantidades nos núcleos de células em proliferação. A estrutura tridimensional da PCNA é muito semelhante àquela da subunidade $\beta$ da DNA-polimerase III de *E. coli* (Figura 25-9b), embora a homologia da sequência primária não seja evidente. PCNA tem uma função análoga àquela da subunidade $\beta$, formando uma braçadeira circular que potencializa muito a processividade da polimerase. A DNA-polimerase $\delta$ tem uma atividade de revisão da exonuclease $3'\rightarrow5'$ e parece executar a síntese tanto da fita líder quanto da retardada em um complexo comparável à DNA-polimerase III bacteriana dimérica.

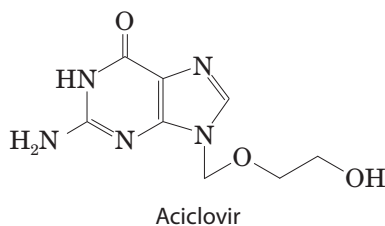
Outra polimerase, ainda, a **DNA-polimerase $\varepsilon$**, substitui a DNA-polimerase $\delta$ em algumas situações, como no reparo do DNA. A DNA-polimerase $\varepsilon$ também pode funcionar na forquilha de replicação, talvez desempenhando um papel análogo àquele da DNA-polimerase I bacteriana, removendo os iniciadores dos fragmentos de Okazaki na fita retardada.

Dois outros complexos proteicos também funcionam na replicação do DNA eucarionte. RPA (proteína de replicação A) é uma proteína de ligação de DNA de fita simples de eucariontes, equivalente em função à proteína SSB de *E. coli.* RFC (fator de replicação C) é um carregador de braçadeiras para PCNA e facilita a montagem dos complexos de replicação ativos. As subunidades do complexo RFC apresentam uma semelhança de sequência significativa com as subunidades do complexo de carregamento de braçadeira (complexo $\gamma$) bacteriano.

Em cromossomos eucariontes lineares, a terminação da replicação envolve a síntese de estruturas especiais denominadas **telômeros** nas extremidades de cada cromossomo, como discutido no próximo capítulo.

## DNA-polimerases virais fornecem alvos para a terapia antiviral

Muitos vírus DNA codificam suas próprias DNA-polimerases, e algumas delas se tornam alvo de medicamentos. Por exemplo, a DNA-polimerase do vírus herpes

simplex é inibida pelo aciclovir, um composto desenvolvido por Gertrude Elion e George Hitchings (p. 923). O aciclovir consiste em uma guanina presa a um anel de ribose incompleto.

Aciclovir

Ele é fosforilado por uma timidina-cinase codificada viralmente; o aciclovir se liga a essa enzima viral com uma afinidade 200 vezes maior que sua ligação à timidina-cinase celular. Isso garante que a fosforilação ocorra principalmente nas células infectadas por vírus. As cinases celulares convertem o aciclo-GMP resultante a aciclo-GTP, que é tanto inibidor quanto substrato de DNA-polimerases. O aciclo-GTP inibe competitivamente a DNA-polimerase do vírus do herpes mais fortemente que as DNA-polimerases celulares. Como não tem uma 3′-hidroxila, o aciclo-GTP também atua como terminador de cadeia quando incorporado ao DNA. Assim a replicação viral é inibida em várias etapas. ■

### RESUMO 25.1 Replicação do DNA

- A replicação do DNA ocorre com fidelidade muito alta e em um tempo determinado no ciclo celular. A replicação é semiconservativa, cada fita atuando como molde para uma nova fita filha. Ela é realizada em três fases identificáveis: iniciação, alongamento e terminação. O processo se inicia em uma única origem em bactérias e normalmente segue bidirecionalmente.
- O DNA é sintetizado na direção 5′→3′ pelas DNA-polimerases. Na forquilha de replicação, a fita líder é sintetizada continuamente na mesma direção do movimento da forquilha de replicação; a fita retardada é sintetizada descontinuamente como fragmentos de Okazaki, os quais são subsequentemente ligados.
- A fidelidade da replicação do DNA é mantida por (1) seleção de bases pela polimerase, (2) atividade de revisão da exonuclease 3′→5′, que faz parte da maioria das DNA-polimerases, e (3) sistema de reparo específicos para malpareamentos (*mismatches*) deixados para trás após a replicação.
- Muitas células têm várias DNA-polimerases. Em *E. coli*, a DNA-polimerase III é a enzima de replicação principal. A DNA-polimerase I é responsável por funções especiais durante a replicação, recombinação e reparo.
- As fases de iniciação, alongamento e terminação separadas da replicação do DNA envolvem uma série de enzimas e fatores proteicos, muitos pertencentes à família AAA+ ATPase.
- A principal DNA-polimerase replicativa em eucariontes é a DNA-polimerase $\delta$. A DNA-polimerase $\alpha$ funciona na síntese de iniciadores. A DNA-polimerase $\varepsilon$ atua no reparo do DNA.

## 25.2 Reparo do DNA

A maioria das células tem apenas dois conjuntos de DNA genômico. Proteínas danificadas e moléculas de RNA podem ser rapidamente substituídas utilizando-se a informação codificada no DNA, mas as moléculas de DNA, em si, são insubstituíveis. Manter a integridade da informação no DNA é um imperativo celular, apoiado por um conjunto elaborado de sistemas de reparo de DNA. O DNA pode ser danificado por vários processos, alguns espontâneos, outros catalisados por agentes ambientais (Capítulo 8). A replicação, em si, pode, muito ocasionalmente, danificar o conteúdo da informação quando erros introduzem pares de bases malpareados (tal como G pareado com T).

A química do dano do DNA é diversa e complexa. A resposta celular a esse dano inclui uma ampla variedade de sistemas enzimáticos que catalisam algumas das mais interessantes transformações químicas no metabolismo do DNA. Primeiro serão examinados os efeitos das alterações na sequência de DNA e depois os sistemas de reparo específicos.

### As mutações estão ligadas ao câncer

A melhor maneira de ilustrar a importância do reparo do DNA é considerar os efeitos do dano no DNA *não reparado* (uma lesão). O resultado mais sério é uma mudança na sequência de bases do DNA, a qual, se replicada e transmitida a gerações de células futuras, se torna permanente. Uma alteração permanente na sequência de nucleotídeos de DNA é chamada de **mutação**. Mutações podem envolver a substituição de um par de bases por outro (mutação de substituição) ou a adição ou deleção de um ou mais pares de bases (mutações de inserção ou deleção). Se a mutação afeta um DNA não essencial ou se ela tem um efeito desprezível na função de um gene, ela é conhecida como **mutação silenciosa**. Em raras ocasiões, uma mutação confere alguma vantagem biológica. A maioria das mutações não silenciosas, entretanto, é neutra ou deletéria.

Em mamíferos, há uma forte correlação entre o acúmulo de mutações e o câncer. Um teste simples desenvolvido por Bruce Ames mede o potencial de um determinado composto químico em promover algumas mutações facilmente detectadas em uma linhagem bacteriana especializada (**Figura 25-20**). Poucas substâncias químicas encontradas no cotidiano pontuam como mutagênicos nesse teste. Entretanto, dos compostos conhecidos por serem carcinogênicos a partir de longos ensaios animais, mais de 90% foram considerados como mutagênicos no teste de Ames. Devido a essa forte correlação entre mutagênese e carcinogênese,

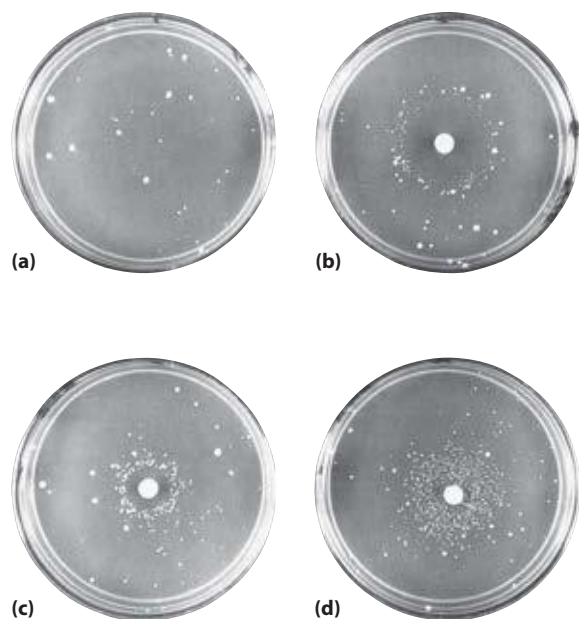



**FIGURA 25-20 Teste de Ames para substâncias carcinogênicas, baseado na sua mutagenicidade.** Uma linhagem de *Salmonella typhimurium* tendo uma mutação que inative uma enzima da via biossintética da histidina é colocada em um meio sem histidina. Poucas células crescem. **(a)** As poucas colônias pequenas de *S. typhimurium* que realmente crescem em um meio livre de histidina carregam mutações reversas espontâneas que permitem que a via biossintética da histidina opere. Três placas de nutrientes idênticas **(b)**, **(c)** e **(d)** foram inoculadas com um número igual de células. Cada placa recebe então um disco ou papel de filtro contendo concentrações progressivamente inferiores de agente mutagênico. Este aumenta muito a taxa de mutação reversa e, portanto, o número de colônias. As áreas vazias em torno do papel de filtro indicam onde a concentração do agente mutagênico é tão alta que é letal para as células. À medida que essa substância se difunde para longe do papel de filtro, ela é diluída para concentrações subletais que promovem a mutação reversa. Os agentes mutagênicos podem ser comparados com base no seu efeito sobre a taxa de mutação. Como muitos compostos passam por uma variedade de transformações químicas depois de entrar nas células, eles algumas vezes são testados para mutagenicidade depois de primeiro serem incubados com um extrato de fígado. Algumas substâncias se revelaram mutagênicas apenas após esse tratamento.

o teste de Ames para agentes mutagênicos bacterianos é amplamente utilizado como triagem rápida e barata para carcinógenos humanos potenciais.

O DNA genômico em uma típica célula de mamífero acumula muitos milhares de lesões durante um período de 24 horas. Entretanto, como resultado do reparo do DNA, menos de 1 em 1.000 se tornam uma mutação. O DNA é uma molécula relativamente estável, mas na ausência dos sistemas de reparo, o efeito cumulativo das reações pouco frequentes, mas danosas, tornaria a vida impossível. ■

## Todas as células têm sistemas de reparo de DNA múltiplos

O número e a diversidade dos sistemas de reparo refletem tanto a importância do reparo do DNA para a sobrevivência celular quanto as diversas fontes de dano ao DNA (Tabela 25-5). Alguns tipos comuns de lesões, tal como os dímeros de pirimidina (ver Figura 8-31), podem ser reparados por vários sistemas distintos. Muitos processos de reparo do DNA também parecem ser extraordinariamente ineficientes energeticamente – uma exceção ao padrão observado na grande maioria das vias metabólicas, onde cada ATP é levado em conta e apresenta uma utilização otimizada. Quando a integridade da informação genética está em jogo, a quantidade de energia química investida em um processo de reparo parece quase irrelevante.

**TABELA 25-5** Tipos de sistemas de reparo de DNA em *E. coli*

| Enzimas/proteínas | Tipo de dano |
|---|---|
| **Reparo de malpareamento** | |
| Dam metilase<br>Proteínas MutH, MutL, MutS<br>DNA-helicase II<br>SSB<br>DNA-polimerase III<br>Exonuclease I<br>Exonuclease VII<br>Nuclease RecJ<br>Exonuclease X<br>DNA-ligase | Malpareamentos |
| **Reparo por excisão de bases** | |
| DNA glicosilases<br>Endonucleases AP<br>DNA-polimerase I<br>DNA-ligase | Bases anormais (uracila, hipoxantina, xantina); bases alquiladas; em alguns outros organismos, dímeros de pirimidina |
| **Reparo por excisão de nucleotídeo** | |
| Excinuclease ABC<br>DNA-polimerase I<br>DNA-ligase | Lesões de DNA que causam grandes mudanças estruturais (p. ex., dímeros de pirimidina) |
| **Reparo direto** | |
| DNA-fotoliases | Dímeros de pirimidina |
| $O^6$-Metilguanina-DNA-metiltransferase | $O^6$-Metilguanina |
| Proteína AlkB | 1-Metilguanina; 3-metilcitosina |

O reparo do DNA é possível, em grande parte, porque a molécula de DNA consiste em duas fitas complementares. O dano no DNA em uma fita pode ser removido e substituído com precisão, utilizando-se a fita complementar não danificada como um molde. Aqui serão considerados os principais tipos de sistemas de reparo, começando com aqueles que reparam os raros malpareamentos de nucleotídeos que foram deixados para trás pela replicação.

**Reparo de malpareamento** A correção dos raros malpareamentos deixados para trás após a replicação em *E. coli* melhora a fidelidade geral da replicação em cerca de $10^2$ a $10^3$ vezes. Os malpareamentos são quase sempre corrigidos para refletir a informação da fita antiga (molde), de modo

que o sistema de reparo deve de algum modo diferenciar entre o molde e a fita sintetizada recentemente. A célula realiza esse processo por meio da marcação do DNA molde com grupos metil para diferenciá-lo das novas fitas sintetizadas. O sistema de reparo de malpareamento de *E. coli* inclui, pelo menos, 12 componentes proteicos (Tabela 25-5) que funcionam ou na discriminação da fita ou no reparo do próprio processo.

O mecanismo de discriminação de fitas não foi decifrado para a maioria das bactérias ou eucariontes, mas é bem compreendido para *E. coli* e algumas espécies de bactérias estreitamente relacionadas. Nessas bactérias, a discriminação da fita se baseia na ação da Dam metilase, que, como você deve se lembrar, metila o DNA na posição $N^6$ de todas as adeninas no interior das sequências (5′)GATC. Imediatamente após a passagem da forquilha de replicação, há um curto período (poucos segundos ou minutos) durante o qual a fita-molde é metilada, mas a fita recém-sintetizada não (**Figura 25-21**). O estado transitório não metilado de sequências GATC na fita recém-sintetizada permite que a nova fita seja diferenciada da fita-molde. Malpareamentos de replicação nas proximidades de uma sequência GATC hemimetilada são, então, reparados de acordo com a informação na fita metilada (molde) parental. Testes *in vitro* demonstram que se ambas as fitas forem metiladas na sequência GATC, poucos malpareamentos são reparados; se nenhuma fita for metilada, o reparo ocorre, mas não favorece qualquer fita. O sistema celular de reparo de malpareamento dirigido por metilação repara de maneira eficiente os malpareamentos de até 1.000 pb de uma sequência GATC hemimetilada.

Como o processo de correção de malpareamento é dirigido pelas sequências GATC relativamente distantes? Um mecanismo é ilustrado na **Figura 25-22**. A proteína MutL forma um complexo com a proteína MutS e o complexo se liga a todos os pares de bases malpareados (exceto C–C). A proteína MutH se liga à MutL e às sequências GATC encontradas pelo complexo MutL-MutS. O DNA de ambos os lados do malpareamento é enroscado no complexo MutL-MutS, criando uma volta de DNA; o movimento simultâneo de ambas as pernas da volta através do complexo equivale ao movimento do complexo em ambas as direções ao mesmo tempo, ao longo do DNA. O MutH tem uma atividade de endonuclease sítio-específica que é inativa até que o complexo encontre uma sequência GATC hemimetilada. Nesse sítio, o MutH catalisa a clivagem da fita não metilada no lado 5′ do G no GATC, o que marca a fita para reparo. Etapas adicionais na via dependem da localização do malpareamento em relação a esse sítio de clivagem (**Figura 25-23**).

**FIGURA 25-21 Metilação e o reparo de malpareamento.** A metilação das fitas de DNA pode servir para distinguir as fitas parentais (molde) das fitas recém-sintetizadas no DNA de *E. coli*, função crucial para o reparo de malpareamento (ver Figura 25-22). A metilação ocorre no $N^6$ das adeninas em sequências (5′)GATC. Esta sequência é um palíndromo (ver Figura 8-18), presente em orientações opostas nas duas fitas.

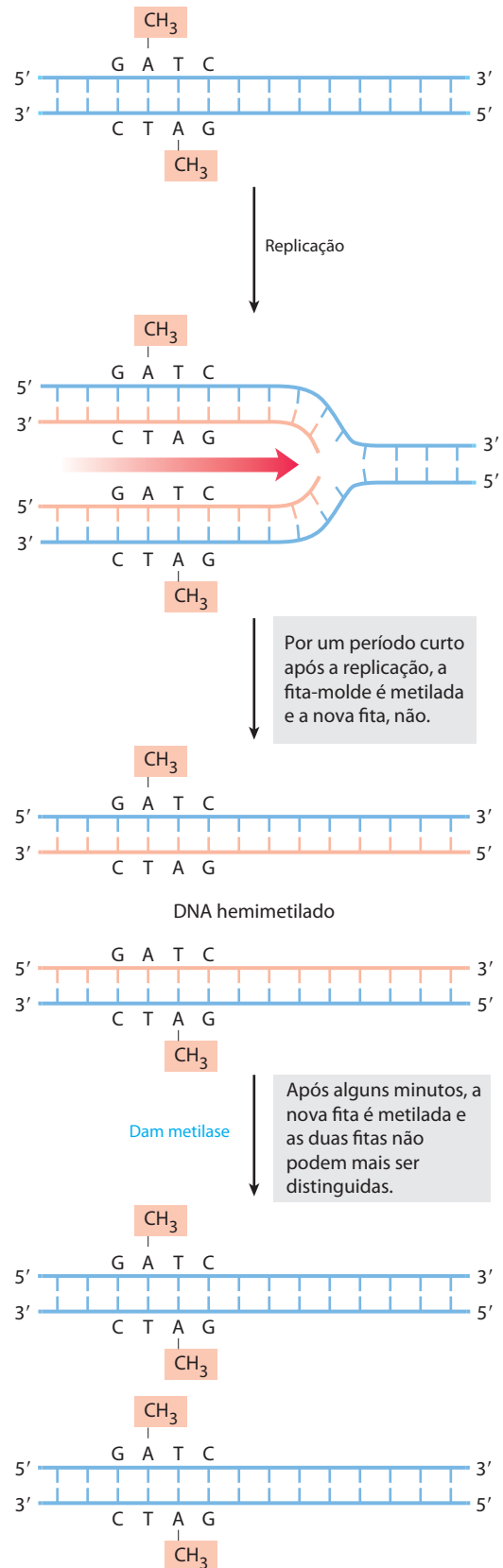
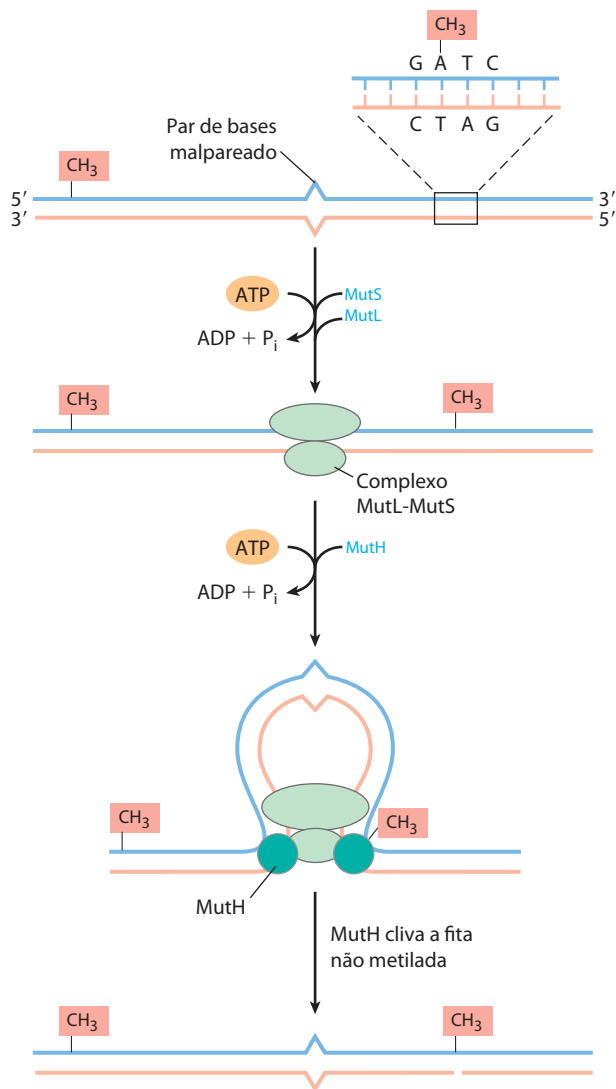



**FIGURA 25-22 Um modelo para as etapas iniciais do reparo de malpareamento direcionado por metil.** As proteínas envolvidas nesse processo em *E. coli* foram purificadas (ver Tabela 25-5). O reconhecimento da sequência (5′)GATC e do malpareamento são funções especializadas das proteínas MutH e MutS, respectivamente. A proteína MutL forma um complexo com MutS no pareamento errado. O DNA é enroscado nesse complexo de modo que o complexo se move simultaneamente em duas direções ao longo do DNA até que ele encontra uma proteína MutH ligada a uma sequência GATC hemimetilada. A MutH cliva a fita não metilada no lado 5′ do G nessa sequência. Um complexo consistindo na DNA-helicase II e em uma de várias exonucleases degrada então a fita de DNA não metilado daquele ponto para o malpareamento (ver Figura 25-23).

Quando o malpareamento é do lado 5′da sítio de clivagem (Figura 25-23, direita), a fita não metilada é desenrolada e degradada na direção 3′→5′ a partir do sítio de clivagem por malpareamento, e esse segmento é substituído por um DNA novo. Esse processo exige a ação combinada da DNA-helicase II (também chamada de UvrD helicase), SSB, exonuclease I ou exonuclease X (ambas as quais degradam fitas de DNA na direção 3′→5′), DNA-polimerase III e DNA-ligase. A via para reparo de malpareamentos no lado 3′ do sítio de clivagem é semelhante (Figura 25-23, esquerda), exceto pelo fato de que a exonuclease é ou a exonuclease VII (que degrada o DNA de fita simples na direção 5′→3′ ou 3′→5′) ou a RecJ nuclease (que degrada DNA de fita simples na direção 5′→3′).

O reparo de malpareamento é um processo particularmente dispendioso para a *E. coli* em termos da energia despendida. Esse malpareamento pode ser de 1.000 pb ou mais a partir da sequência GATC. A degradação e a substituição de um segmento de fita desse comprimento exigem um investimento enorme em precursores de desoxinucleotídeos ativados para reparar uma *única* base malpareada. Isso reforça mais uma vez a importância da integridade genômica para a célula.

Todas as células eucariontes têm várias proteínas estruturalmente e funcionalmente análogas às proteínas bacterianas MutS e MutL (mas não MutH). Alterações nos genes humanos que codificam proteínas desse tipo produzem algumas das síndromes hereditárias mais comuns de suscetibilidade ao câncer (ver Quadro 25-1, p. 1037), o que demonstra ainda mais o valor para o organismo dos sistemas de reparo do DNA. Os principais homólogos de MutS, na maior parte dos eucariontes, de leveduras a humanos, são a MSH2 (*h*omóloga de *M*ut*S*), a MSH3 e a MSH6. Heterodímeros de MSH2 e MSH6 geralmente se ligam a malpareamentos de um único par de bases e se ligam com mais dificuldade a voltas malpareadas um pouco mais longas. Em muitos organismos, os malpareamentos mais longos (2 a 6 pb) podem estar ligados, em vez disso, a um heterodímero de MSH2 e MSH3 ou estar ligados por ambos os tipos de heterodímeros em tandem. Homólogos de MutL, predominantemente um heterodímero de MLH1 (homólogo 1 de MutL) e PMS1 (segregação pós-meiótica), se ligam a e estabilizam os complexos MSH. Muitos detalhes dos eventos subsequentes no reparo de malpareamento em eucariontes continuam a ser decifrados. Em particular, não se conhece o mecanismo pelo qual fitas de DNA recém-sintetizadas são identificadas, embora pesquisas tenham revelado que essa identificação da fita não envolve sequências GATC.

**Reparo de excisão de base** Cada célula tem uma classe de enzimas denominadas **DNA-glicosilases** que reconhecem lesões particularmente comuns no DNA (como os produtos da desaminação da citosina e da adenina; ver Figura 8-30a) e removem a base afetada por meio da clivagem da ligação *N*-glicosil. Essa clivagem cria um sítio apurínico ou apirimidínico no DNA, comumente denominado **sítio AP** ou **sítio abásico**. Cada DNA-glicosilase é geralmente específica para um tipo de lesão.

As uracila DNA-glicosilases, por exemplo, encontradas na maioria das células, removem especificamente do DNA o uracila que é resultado da desaminação espontânea da citosina. Células mutantes sem essa enzima apresentam uma taxa elevada de G≡C para mutações A═T. Essa glicosilase não remove resíduos de uracila do RNA ou resíduos de timina do DNA. A capacidade para distinguir a timina do uracila, o produto da desaminação da citosina – necessário para o reparo seletivo da última – pode ser uma razão pela qual o DNA evoluiu para conter timina em vez de uracila (p. 299).

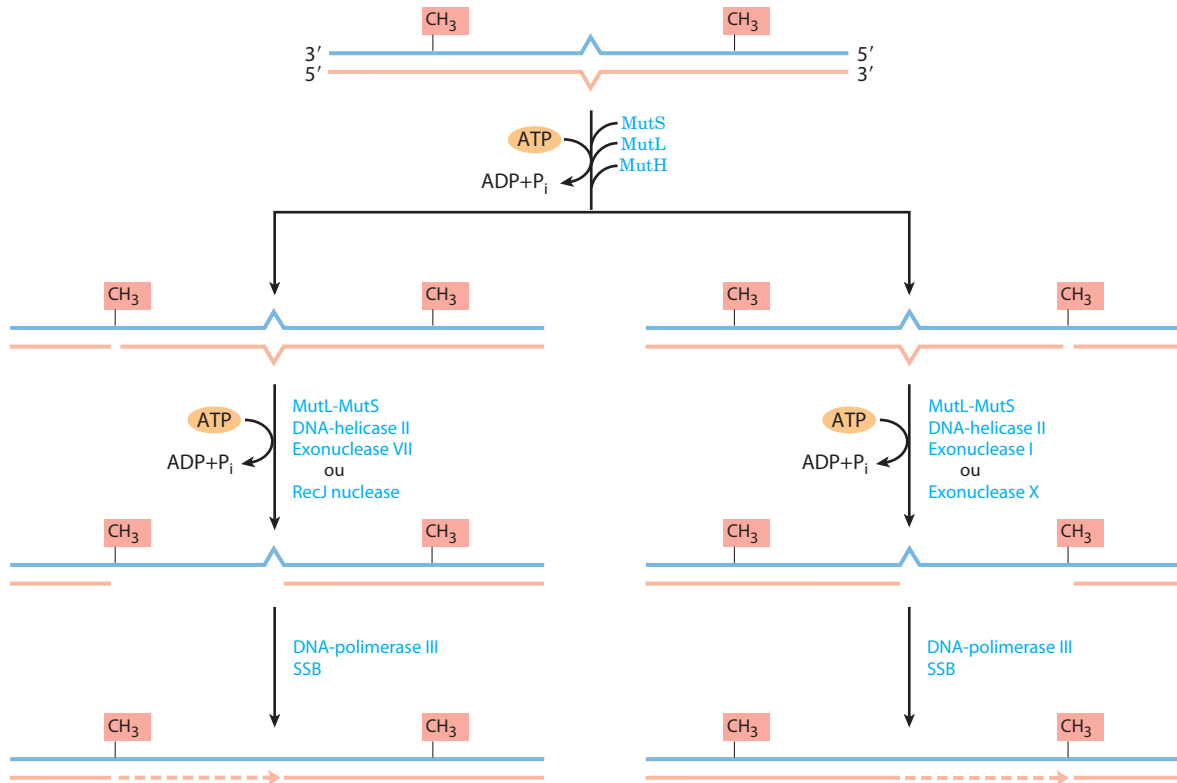



**FIGURA 25-23 Concluindo o reparo de malpareamento direcionado por metil.** A ação combinada da DNA-helicase II, SSB e de uma de quatro diferentes exonucleases remove um segmento da nova fita entre o sítio de clivagem MutH e um ponto logo adiante do malpareamento. A exonuclease usada depende da localização do sítio de clivagem em relação ao malpareamento, como mostrado aqui pelas vias alternativas. O intervalo resultante é preenchido (linha tracejada) pela DNA-polimerase III, e o corte é selado pela DNA-ligase (não mostrada).

A maioria das bactérias tem apenas um tipo de uracila DNA-glicosilase, ao passo que os seres humanos possuem pelo menos quatro tipos, com especificidades diferentes – indicador da importância da remoção do uracila do DNA. A uracila-glicosilase mais abundante em humanos, UNG, está associada ao replissomo humano, onde elimina o resíduo U ocasional inserido no lugar de um T durante a replicação. A desaminação de resíduos C é 100 vezes mais rápida no DNA de fita simples do que no DNA de fita dupla, e humanos possuem a enzima hSMUG1, que remove qualquer resíduo U que ocorra no DNA de fita simples durante a replicação ou transcrição. Duas outras DNA-glicosilases humanas, TDG e MBD4, removem tanto resíduos U quanto T pareados com G, produzidos pela desaminação de citosina ou 5-metilcitosina, respectivamente.

Outras DNA-glicosilases reconhecem e removem várias bases danificadas, incluindo a formamidopirimidina e a 8-hidroxiguanina (ambas derivadas da oxidação da purina), hipoxantina (derivada da desaminação da adenina) e bases alquiladas, como a 3-metiladenina e a 7-metilguanina. Glicosilases que reconhecem outras lesões, incluindo os dímeros de pirimidina, também foram identificadas em algumas classes de organismos. Lembre-se de que os sítios AP também são derivados da hidrólise lenta e espontânea das ligações *N*-glicosil no DNA (ver Figura 8-30b).

Uma vez que o sítio AP tenha se formado por uma DNA--glicosilase, outro tipo de enzima deve repará-lo. O reparo *não* é realizado pela simples inserção de uma nova base e reformação da ligação *N*-glicosil. Em vez disso, a desoxirribose-5′-fosfato deixada para trás é removida e substituída por um novo nucleotídeo. Esse processo começa com uma das **AP endonucleases**, enzimas que cortam a fita de DNA que contém o sítio AP. A posição da incisão em relação ao sítio AP (5′ ou 3′ em relação ao sítio) varia de acordo com o tipo de AP endonuclease. Um segmento de DNA incluindo o sítio AP é, então, removido, a DNA-polimerase I substitui o DNA, e a DNA-ligase fecha o corte remanescente (**Figura 25-24**). Em eucariontes, a substituição do nucleotídeo é realizada por polimerases específicas, como descrito a seguir.

**Reparo de excisão de nucleotídeos** Lesões no DNA que provocam grandes distorções na estrutura helicoidal do DNA geralmente são reparadas pelo sistema de excisão de nucleotídeos, uma via de reparo crítica para a sobrevivência de todos os organismos de vida livre. No reparo de excisão de nucleotídeos (**Figura 25-25**), uma enzima de multissubunidades (excinuclease) hidrolisa duas ligações fosfodiésteres, uma de cada lado da distorção provocada pela lesão. Em *E. coli* e outras bactérias, o sistema enzimático hidrolisa a quinta ligação fosfodiéster no lado 3′ e a oitava ligação fosfodiéster no lado 5′ para gerar um fragmento de 12 a 13 nucleotídeos (dependendo se a lesão envolve uma ou duas bases). Em humanos e outros eucariontes, o

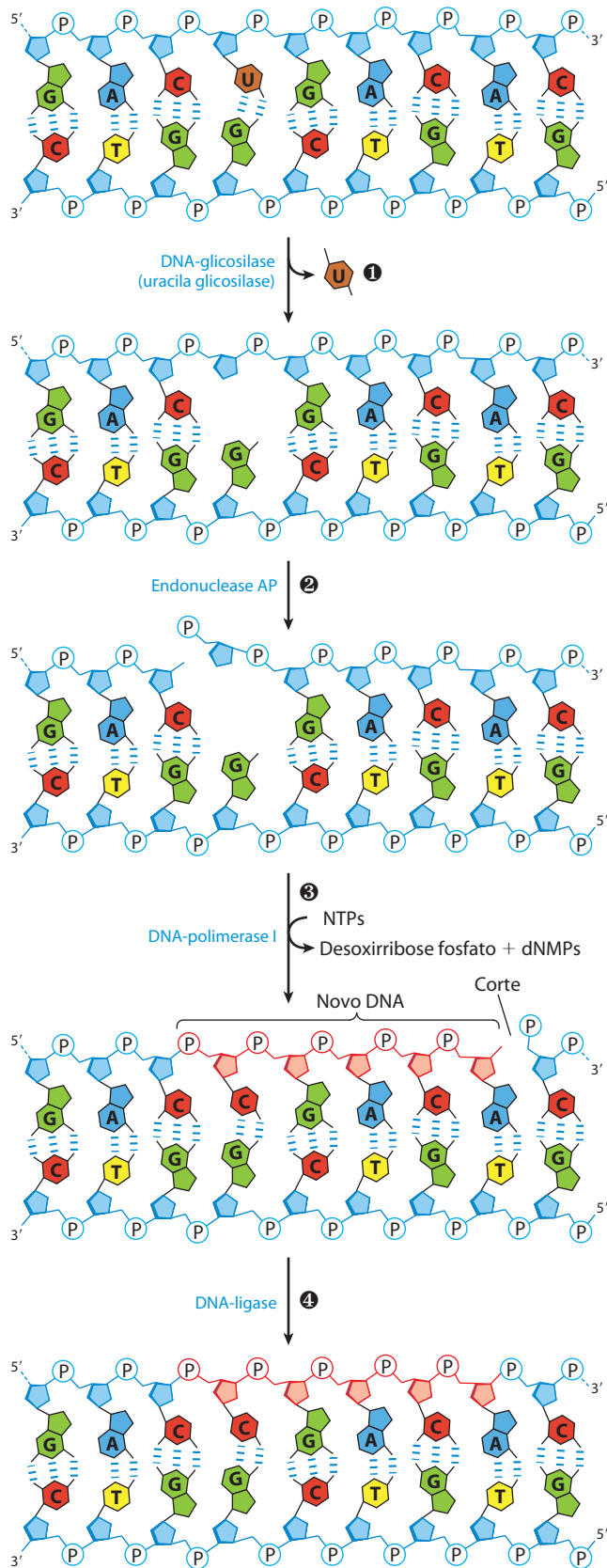



**FIGURA 25-24 Reparo do DNA pela via do reparo por excisão de bases.** ❶ Uma DNA-glicosilase reconhece uma base danificada (nesse caso uma uracila) e cliva entre a base e a desoxirribose no esqueleto do DNA. ❷ Uma endonuclease AP cliva o esqueleto de fosfodiéster perto do sítio AP. ❸ A DNA-polimerase I inicia a síntese de reparo a partir da hidroxila 3′ no corte, removendo (com sua atividade de exonuclease 5′→3′) e substituindo uma porção da fita danificada. ❹ O corte remanescente depois que a DNA-polimerase I se dissociou é selado pela DNA-ligase.

sistema enzimático hidrolisa a sexta ligação fosfodiéster no lado 3′ e a vigésima segunda ligação fosfodiéster no lado 5′, produzindo um fragmento de 27 a 29 nucleotídeos. Após a incisão dupla, os oligonucleotídeos retirados são liberados do duplex, e o espaço resultante é preenchido – pela DNA-polimerase I em *E. coli* e pela DNA-polimerase $\varepsilon$ em humanos. A DNA-ligase fecha o corte.

Em *E. coli*, o complexo enzimático chave é a excinuclease ABC, que possui três subunidades, UvrA ($M_r$ 104.000), UvrB ($M_r$ 78.000) e UvrC ($M_r$ 68.000). O termo "excinuclease" é utilizado para descrever a capacidade única desse complexo enzimático de catalisar duas clivagens endonucleotídicas específicas, diferenciando essa atividade daquela de endonucleases-padrão. Um complexo de proteínas UvrA e UvrB (A2B) analisa o DNA e se liga ao sítio da lesão. O dímero UvrA, então, se dissocia, liberando um forte complexo UvrB-DNA. A proteína UvrC, então, se liga à UvrB, e a UvrB faz uma incisão na quinta ligação fosfodiéster, no lado 3′ da lesão. Segue-se uma incisão mediada por UvrC na oitava ligação fosfodiéster no lado 5′. O fragmento resultante de 12 a 13 nucleotídeos é removido pela UvrD-helicase. O pequeno intervalo criado desse modo é preenchido pela DNA-polimerase I e pela DNA-ligase. Essa via (Figura 25-25, esquerda) é a principal rota de reparo para muitos tipos de lesões, incluindo os dímeros de ciclobutano pirimidina, 6-4 fotoprodutos (ver Figura 8-31), e vários outros tipos de adutos de bases, incluindo a benzo[*a*]pireneguanina, que é formada no DNA pela exposição à fumaça de cigarro. A atividade nucleolítica da excinuclease ABC é nova no sentido em que dois cortes são feitos no DNA.

O mecanismo das excinucleases de eucariontes é muito semelhante àquele da enzima bacteriana, embora sejam necessários 16 polipeptídeos sem qualquer semelhança com as subunidades excinuclease de *E. coli* para a incisão dupla. Como descrito no Capítulo 26, alguns dos reparos de excisão de nucleotídeos e reparos de excisão de bases em eucariontes estão intimamente ligados à transcrição. As deficiências genéticas em reparo de excisão de nucleotídeos em humanos levam a várias doenças graves (ver Quadro 25-1).

**Reparo direto** Vários tipos de danos são reparados sem a remoção de uma base ou nucleotídeo. O exemplo mais bem caracterizado é a fotorreativação direta dos dímeros de ciclobutano pirimidina, reação promovida pelas **DNA-fotoliases**. Os dímeros de pirimidina resultam de uma reação induzida por UV, e as fotoliases utilizam energia derivada da luz absorvida para reverter o dano (**Figura 25-26**). As fotoliases geralmente contêm dois cofatores que funcionam

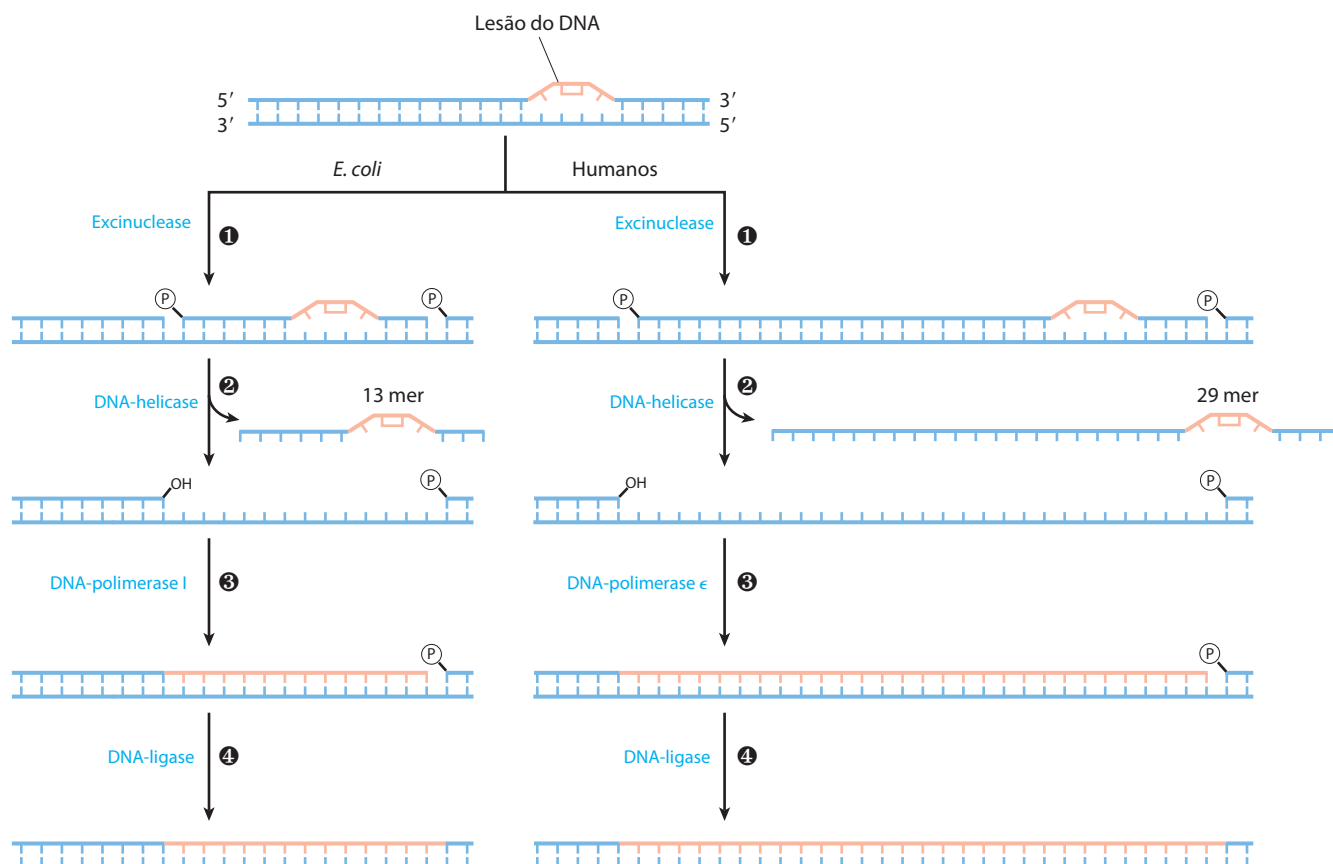
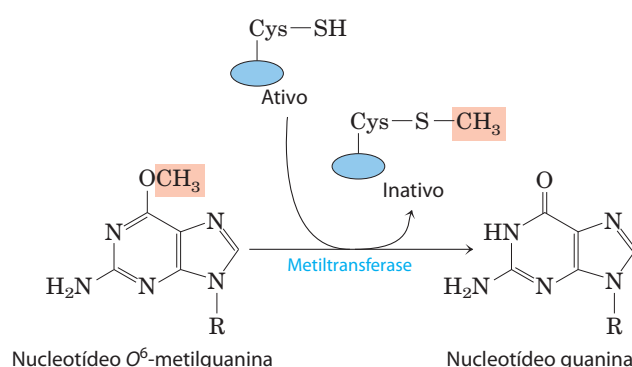
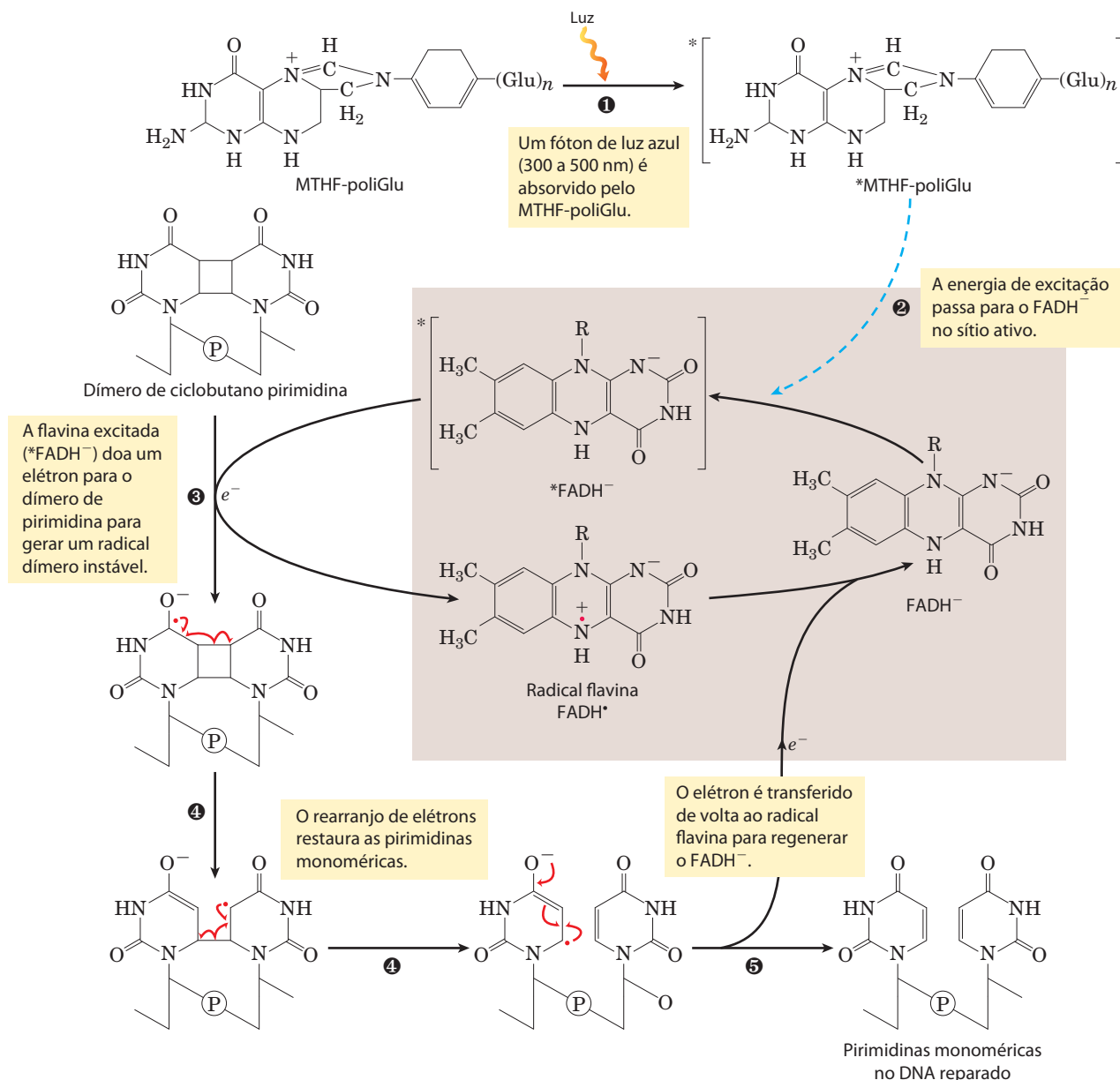



**FIGURA 25-25 Reparo por excisão de nucleotídeos em *E. coli* e humanos.** A via geral do reparo por excisão de nucleotídeos é semelhante em todos os organismos. ❶ Uma excinuclease se liga ao DNA no local de uma lesão extensa e cliva a fita do DNA lesionado de cada lado da lesão. ❷ O segmento de DNA – de 13 nucleotídeos (13 mer) ou 29 nucleotídeos (29 mer) – é removido com o auxílio da helicase. ❸ O intervalo é preenchido pela DNA-polimerase, e ❹ o corte remanescente é selado com a DNA-ligase.

como agentes de absorção de luz, ou cromóforos. Um dos cromóforos é sempre FADH-FADH2. Em *E. coli* e leveduras, o outro cromóforo é um folato. O mecanismo de reação implica a geração de radicais livres. As DNA-fotoliases estão ausentes nas células de mamíferos placentários (que incluem os seres humanos).

Exemplos adicionais podem ser observados no reparo de nucleotídeos com dano por alquilação. O nucleotídeo modificado $O^6$-metilguanina se forma na presença de agentes alquilantes e é uma lesão altamente mutagênica e comum (p. 302). Ele tende a parear com timina em vez de citosina durante a replicação e, portanto, provoca mutações G≡C para A═T (**Figura 25-27**). Reparo direto de $O^6$-metilguanina é realizado por $O^6$-metilguanina-DNA metiltransferase, proteína que catalisa a transferência do grupo metil da $O^6$-metilguanina para um de seus próprios resíduos Cys. Essa metiltransferase não é estritamente uma enzima, porque um único evento de transferência de metil acaba por metilar permanentemente a proteína, tornando-a inativa nessa via. O consumo de uma molécula inteira de proteína para corrigir uma única base danificada é outra vívida ilustração da prioridade dada à manutenção da integridade do DNA celular.

Cys—SH
Ativo
Cys—S—$CH_3$
Inativo
$OCH_3$
Metiltransferase
Nucleotídeo $O^6$-metilguanina
Nucleotídeo guanina

Um mecanismo muito diferente, mas igualmente direto, é utilizado para reparar 1-metiladenina e 3-metilcitosina. Os grupos aminos dos resíduos A e C são algumas vezes metilados quando o DNA é uma fita simples, e a metilação afeta diretamente o pareamento de bases adequado. Em *E. coli*, a desmetilação oxidativa desses nucleotídeos alquilados é mediada pela proteína AlkB, um membro da superfamília dioxigenase dependente de α-cetoglutarato-$Fe^{2+}$ (**Figura 25-28**). (Ver no Quadro 4-3 a descrição de outro membro dessa família de enzimas.)

**MECANISMO – FIGURA 25-26 Reparo dos dímeros de pirimidina com fotoliase.** A energia derivada da luz absorvida é usada para reverter a fotorreação que causou a lesão. Os dois cromóforos na fotoliase da *E. coli* ($M_r$ 54.000), $N^5$,$N^{10}$-meteniltetra-hidrofolilpoliglutamato (MTHFpoliGlu) e $FADH^-$, realizam funções complementares. O MTHFpoliGlu funciona como fotoantena para absorver fótons de luz azul. A energia de excitação passa para o $FADH^-$, e a flavina excitada ($*FADH^-$) doa um elétron para o dímero de pirimidina, levando a um rearranjo, como mostrado.

## A interação das forquilhas de replicação com o dano do DNA pode levar à síntese de DNA translesão propensa a erro

As vias de reparo consideradas até agora geralmente trabalham apenas para lesões no DNA de fita dupla, a fita não danificada fornecendo a informação genética correta para restaurar a fita danificada ao seu estado original. Entretanto, em alguns tipos de lesões, como as quebras na fita dupla, ligações cruzadas na fita dupla ou lesões em um DNA de fita simples, a fita complementar é, ela mesma, danificada, ou está ausente. Quebras na fita dupla e lesões no DNA de fita simples surgem mais frequentemente quando uma forquilha de replicação encontra uma lesão não reparada no DNA (**Figura 25-29**). Tais lesões e as ligações cruzadas de DNA também podem resultar de radiação ionizante e reações oxidativas.

Em uma forquilha de replicação parada em bactérias, há dois caminhos para reparo. Na ausência de uma segunda fita, a informação necessária para um reparo preciso deve vir de um cromossomo separado e homólogo. O sistema de reparo envolve, portanto, recombinação genética de homólogos. Esse reparo recombinante de DNA é descrito em detalhes na Seção 25.3. Em algumas condições, uma segunda via de reparo, a **síntese de DNA translesão propensa a erro** (frequentemente abreviada como TLS), se torna

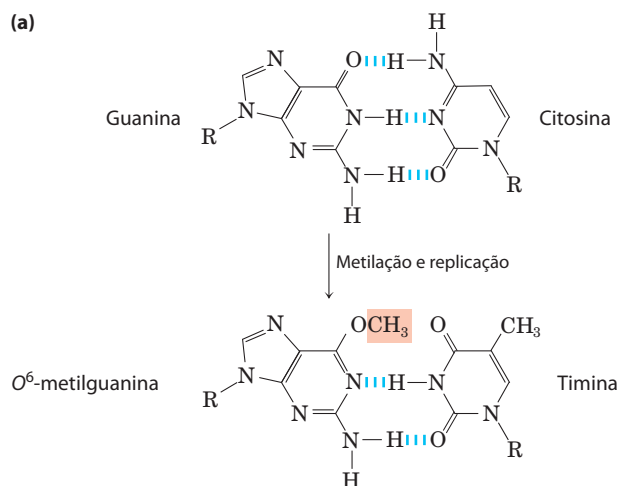
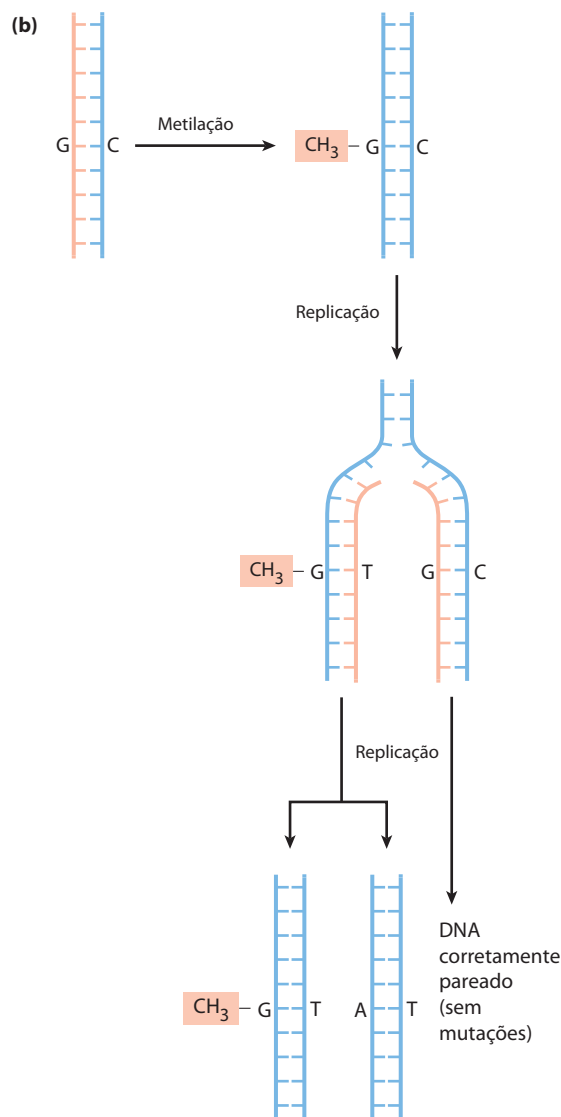



**FIGURA 25-27 Exemplo de como a lesão do DNA resulta em mutações. (a)** O produto da metilação $O^6$-metilguanina pareia com a timina em vez da citosina. **(b)** Se não for reparado, isso leva a uma mutação G≡C para A═T após a replicação.

disponível. Quando essa via é ativa, o reparo do DNA se torna significativamente menos preciso e pode resultar em uma alta taxa de mutação. Em bactérias, a síntese de DNA translesão propensa a erro é parte de uma resposta de estresse celular a extenso dano ao DNA, conhecido, muito apropriadamente, como **resposta SOS**. Algumas proteínas SOS, como as proteínas UvrA e UvrB já descritas, estão normalmente presentes na célula, mas são induzidas a níveis mais elevados, como parte da resposta SOS (Tabela 25-6). Proteínas SOS adicionais participam da via para reparo de propensão ao erro; essas incluem as proteínas

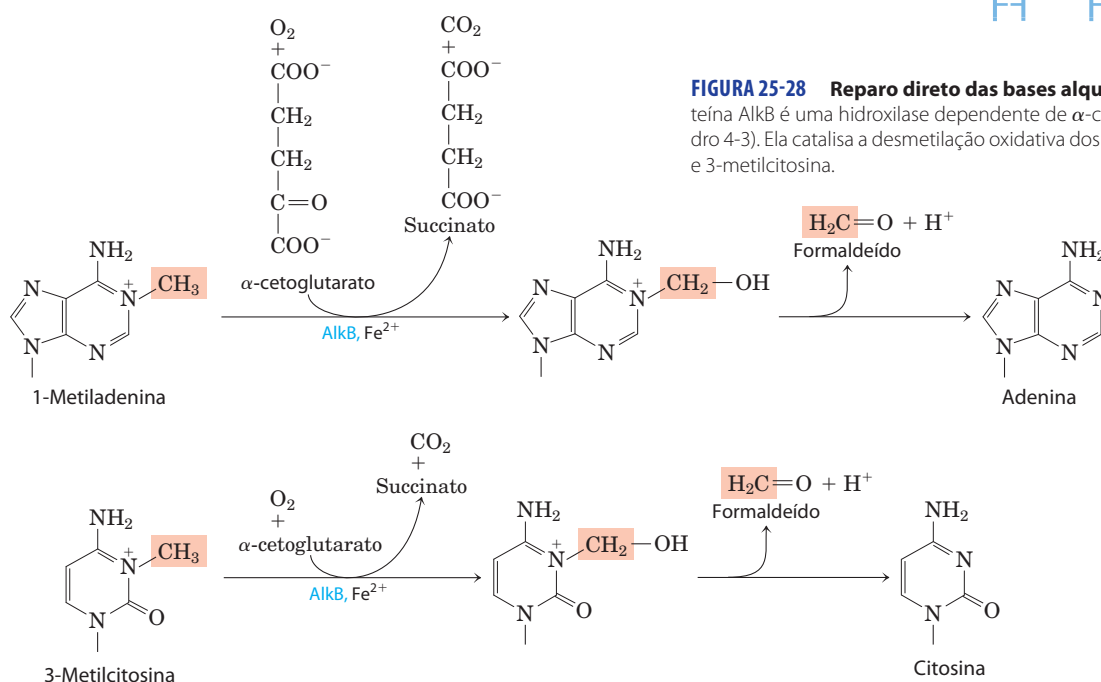



**FIGURA 25-28 Reparo direto das bases alquilatadas por AlkB.** A proteína AlkB é uma hidroxilase dependente de α-cetoglutarato-$Fe^{2+}$ (ver Quadro 4-3). Ela catalisa a desmetilação oxidativa dos resíduos de 1-metiladenina e 3-metilcitosina.

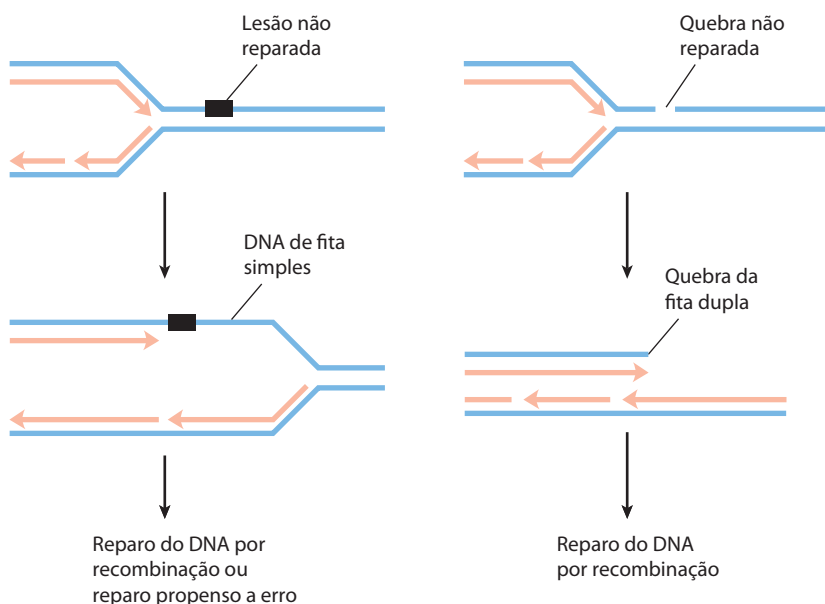



**FIGURA 25-29 Lesão do DNA e seu efeito na replicação do DNA.** Se a forquilha de replicação encontra uma lesão não reparada ou quebra na fita, a replicação geralmente para e a forquilha pode colapsar. Uma lesão é deixada para trás em um segmento de DNA de fita simples não replicado (esquerda); uma quebra de fita se torna uma quebra de fita dupla (direita). Em cada caso o dano a uma fita não pode ser reparado pelos mecanismos descritos anteriormente neste capítulo, pois a fita complementar necessária para dirigir o reparo preciso é lesionada ou está ausente. Há dois possíveis caminhos para o reparo: reparo do DNA por recombinação (uma via é descrita na Figura 25-30) ou, quando as lesões são anormalmente numerosas, reparo propenso a erro. Este último mecanismo envolve uma nova polimerase (DNA-polimerase V, codificada pelos genes *umuC* e *umuD*) que pode se replicar, ainda que imprecisamente, sobre muitos tipos de lesões. O mecanismo de reparo é "propenso a erro" porque frequentemente ocorrem mutações.

UmuC e UmuD ("Umu" de imutável (*unmu*table); a ausência da função do gene *umu* elimina o reparo de propensão ao erro). A proteína UmuD é clivada em um processo regulado por SOS para uma forma mais curta denominada UmuD′, que forma um complexo com a UmuC e uma proteína denominada RecA (descrita na Seção 25.3) para criar uma DNA-polimerase especializada, a DNA-polimerase V ($UmuD'_2UmuCRecA$), que pode replicar muitas das lesões de DNA anteriores que poderiam normalmente bloquear a replicação. O pareamento de bases adequado é com frequência impossível no sítio de tal lesão, de modo que essa replicação translesão é propensa a erro.

Dada a ênfase na importância da integridade genômica ao longo desse capítulo, a existência de um sistema que aumenta a taxa de mutação pode parecer incoerente. Entretanto, é possível pensar nesse sistema como uma estra-

**TABELA 25-6** Genes induzidos como parte da resposta SOS em *E. coli*

| Nome do gene | Proteína codificada e/ou papel no reparo do DNA |
|---|---|
| **Genes de função conhecida** | |
| *polB (dinA)* | Codifica a subunidade de polimerização da DNA-polimerase II, necessária para o reinício da replicação no reparo do DNA por recombinação |
| *uvrA* }<br>*uvrB* } | Codifica as subunidades UvrA e UvrB da excinuclease ABC |
| *umuC* }<br>*umuD* } | Codifica as subunidades central e de polimerização da DNA-polimerase V |
| *sulA* | Codifica a proteína que inibe a divisão celular, possivelmente para dar tempo para o reparo do DNA |
| *recA* | Codifica a proteína RecA, necessária ao reparo propenso a erro e ao reparo por recombinação |
| *dinB* | Codifica a DNA-polimerase IV |
| *ssb* | Codifica a proteína de ligação do DNA de fita simples (SSB) |
| *himA* | Codifica a subunidade do fator de integração do hospedeiro (IHF), envolvido na recombinação sítio-específica, replicação, transposição, regulação da expressão gênica |
| **Genes envolvidos no metabolismo do DNA, mas papel no reparo do DNA desconhecido** | |
| *uvrD* | Codifica a DNA-helicase II (proteína de desenrolamento do DNA) |
| *recN* | Necessária para o reparo por recombinação |
| **Genes de função desconhecida** | |
| *dinD* | |
| *dinF* | |

**Nota:** Alguns dos genes e suas funções são discutidos adicionalmente no Capítulo 28.

tégia desesperada. Os genes *umuC* e *umuD* são totalmente induzidos apenas no final da resposta SOS, e eles não são ativados para a síntese translesão iniciada pela clivagem umuD a menos que os níveis de dano ao DNA sejam particularmente elevados e todas as forquilhas de replicação sejam bloqueadas. As mutações resultantes da replicação mediada pela DNA-polimerase V matam algumas células e criam mutações deletérias em outras, mas esse é o preço metabólico que uma espécie paga para superar o que de outro modo seria uma barreira intransponível para a replicação, uma vez que ela permite, pelo menos, a sobrevivência de poucas células-filhas mutantes.

Contudo, outra DNA-polimerase, a DNA-polimerase IV, também é induzida durante a resposta SOS. A replicação pela DNA-polimerase IV, um produto do gene *dinB*, é também altamente propensa a erro. As DNA-polimerases bacterianas IV e V são parte de uma família de TLS polimerases encontradas em todos os organismos. Essas enzimas não têm uma exonuclease de revisão e têm um sítio ativo mais aberto que acomoda nucleotídeos moldes danificados. A fidelidade da seleção de bases durante a replicação pode ser reduzida por um fator de $10^2$, diminuindo a fidelidade total da replicação para um erro em aproximadamente 1.000 nucleotídeos.

Mamíferos têm muitas DNA-polimerases de baixa fidelidade da família das polimerases TLS. Entretanto, a presença dessas enzimas não se traduz, necessariamente, em um inaceitável fardo mutacional, porque a maior parte dessas enzimas também tem funções especializadas no reparo do DNA. A DNA-polimerase $\eta$ (eta), por exemplo, encontrada em todos os eucariontes, promove a síntese translesão principalmente por meio de dímeros T – T do ciclobutano. Poucas mutações resultam nesse caso porque a enzima insere preferencialmente dois resíduos A a partir dos resíduos T ligados. Várias outras polimerases de baixa fidelidade, incluindo as DNA-polimerases $\beta$, $\iota$ (iota) e $\lambda$, têm funções especializadas no reparo de excisão de base de eucariontes. Cada uma dessas enzimas tem uma atividade 5′-desoxirribose-fosfato-liase além de sua atividade de polimerase. Após a remoção de base por uma glicosilase e clivagem do esqueleto por uma AP endonuclease, essas polimerases removem o sítio abásico (uma 5′-desoxirribose-fosfato) e preenchem o espaço muito curto. A frequência de mutação devido à atividade da DNA-polimerase $\eta$ é minimizada pelos comprimentos muito curtos (frequentemente um nucleotídeo) de DNA sintetizado.

O que surge a partir de pesquisas dos sistemas de reparo de DNA celular é o cenário de um metabolismo de DNA que mantém a integridade genômica com sistemas múltiplos e, com frequência, redundantes. No genoma humano, mais de 130 genes codificam proteínas dedicadas ao reparo do DNA. Em muitos casos, a perda de função de uma dessas proteínas resulta em instabilidade genômica e em um aumento na ocorrência de oncogênese (Quadro 25-1). Esses sistemas de reparo são frequentemente integrados com os sistemas de replicação do DNA e são complementados por sistemas de recombinação, abordada a seguir.

**QUADRO 25-1**  **MEDICINA Reparo do DNA e câncer**

Os cânceres em seres humanos se desenvolvem quando genes que regulam a divisão celular normal (oncogenes e genes supressores de tumor; Capítulo 12) não funcionam, são ativados no momento errado ou são alterados. Como consequência, as células podem crescer sem controle e formar um tumor. Os genes que controlam a divisão celular podem ser danificados por mutação espontânea ou substituídos pela invasão de um vírus tumoral (Capítulo 26). Não é surpreendente que alterações nos genes de reparo do DNA que resultam em uma taxa aumentada de mutação elevem enormemente a suscetibilidade de um indivíduo ao câncer. Defeitos nos genes que codificam as proteínas envolvidas no reparo de excisão de nucleotídeos, reparo de malpareamento, reparo de recombinação e síntese de DNA translesão propensa a erro estão todos ligados a cânceres em seres humanos.

Claramente, o reparo do DNA pode ser uma questão de vida e morte. O reparo de excisão de nucleotídeos necessita de um número maior de proteínas em humanos do que em bactérias, embora as vias gerais sejam bastante semelhantes. Os defeitos genéticos que inativam o reparo de excisão de nucleotídeos foram associados a várias doenças genéticas; a mais bem estudada é o xeroderma pigmentoso (XP). Como o reparo de excisão de nucleotídeos é a única via de reparo para dímeros de pirimidina em humanos, pessoas com XP são extremamente sensíveis à luz e rapidamente desenvolvem cânceres de pele induzidos pela luz do sol. A maior parte das pessoas com XP também apresenta anormalidades neurológicas, presumivelmente devido a sua inabilidade em reparar algumas lesões causadas por uma alta taxa de metabolismo oxidativo em neurônios. Defeitos nos genes que codificam qualquer um de pelo menos sete componentes proteicos diferentes do sistema de reparo de excisão de nucleotídeos podem resultar em XP, levando ao surgimento de sete grupos genéticos diferentes denominados de XPA até XPG. Várias dessas proteínas (notadamente aquelas com defeitos em XPB, XPD e XPG) também desempenham papéis no reparo de excisão de bases acoplado à transcrição de lesões oxidativas, descrito no Capítulo 26.

A maioria dos microrganismos tem vias redundantes para o reparo de dímeros de ciclobutano pirimidina – lançando mão de DNA-fotoliases e, algumas vezes, do reparo de excisão de bases, como alternativas ao reparo de excisão de nucleotídeos – exceto em humanos e em outros mamíferos placentários. Essa ausência de um *backup* para o reparo de excisão de nucleotídeos para remover dímeros de pirimidina levou à especulação de que a evolução inicial de mamíferos envolveu pequenos animais noturnos e peludos com pouca necessidade de reparo de danos UV. Entretanto, mamíferos de fato possuem uma

*(Continua na próxima página)*

**QUADRO 25-1**  **MEDICINA** **Reparo do DNA e câncer (*Continuação*)**

via para evitar a translesão de dímeros de ciclobutano pirimidina, que envolve a DNA-polimerase $\eta$. Essa enzima insere preferencialmente dois resíduos A opostos ao dímero de pirimidina T-T, minimizando as mutações. Pessoas com uma condição genética na qual a função da DNA-polimerase $\eta$ está ausente exibem uma doença semelhante ao XP, conhecida como variante XP ou XP-V. As manifestações clínicas de XP-V são semelhantes àquelas das doenças XP clássicas, embora os níveis de mutação sejam mais elevados na XP-V quando as células são expostas à luz UV. Aparentemente, o sistema de reparo de excisão de nucleotídeos trabalha em conjunto com a DNA-polimerase $\eta$ nas células humanas normais, reparando e/ou ignorando os dímeros de pirimidina segundo o necessário para manter o crescimento celular e o andamento da replicação do DNA. A exposição à luz UV introduz uma carga pesada de dímeros de pirimidina, e alguns devem ser ignorados pela síntese translesão para manter a replicação em curso. Quando um sistema está ausente, ele é parcialmente compensado pelo outro. Uma perda da atividade de DNA-polimerase $\eta$ leva à parada das forquilhas de replicação e ao desvio das lesões UV pelas polimerase de síntese translesão (TLS) diferentes e mais mutagênicas. Como ocorre quando outros sistemas de reparo de DNA estão ausentes, o aumento resultante de mutações com frequência leva ao câncer.

Uma das síndromes hereditárias mais comuns de suscetibilidade ao câncer é o câncer de colo hereditário não polipoide (HNPCC). Essa síndrome foi associada a defeitos de reparo de malpareamento. Células humanas e de outros eucariontes têm várias proteínas análogas às proteínas bacterianas MutL e MutS (ver Figura 25-22). Defeitos em pelo menos cinco genes de reparo de malpareamento podem levar à HNPCC. Os mais prevalentes são os defeitos nos genes *hMLH1* (homólogo 1 ao MutL humano) e *hMSH2* (homólogo 2 ao MutS humano). Em indivíduos com HNPCC, o câncer geralmente se desenvolve em idade precoce, sendo os cânceres de colo os mais comuns.

A maioria dos cânceres de mama humanos ocorre em mulheres sem qualquer predisposição conhecida. Entretanto, cerca de 10% dos casos são associados a defeitos hereditários em dois genes, *BRCA1* e *BRCA2*. As BRCA1 e BRCA2 humanas são proteínas grandes (1.834 e 3.418 resíduos de aminoácidos, respectivamente) que interagem com várias outras proteínas envolvidas na transcrição, manutenção de cromossomos, reparo do DNA e controle do ciclo celular. A BRCA2 foi implicada no reparo recombinante do DNA de quebras da fita dupla. Entretanto, a função molecular precisa da BRCA1 e da BRCA2 nesses vários processos celulares ainda não é clara. Mulheres com defeitos em ambos os genes *BRCA1* ou *BRCA2* têm uma chance maior que 80% de desenvolver câncer de mama.

## RESUMO 25.2 Reparo de DNA

- As células têm vários sistemas para reparo do DNA. O reparo de malpareamento em *E. coli* é direcionado por sequências transitórias não metiladas de (5′)GATC na fita recém-sintetizada.
- Sistemas de reparo de excisão de bases reconhecem e reparam danos causados por agentes ambientais (tais como radiação e agentes alquilantes) e reações espontâneas de nucleotídeos. Alguns sistemas de reparo reconhecem e excisam apenas bases danificadas ou incorretas, deixando um sítio AP (abásico) no DNA. Esse é reparado pela excisão e substituição do segmento de DNA que contém o sítio AP.
- Os sistemas de reparo de excisão de nucleotídeos reconhecem e removem várias lesões extensas e dímeros de pirimidina. Eles retiram um segmento de fita de DNA que inclui a lesão, deixando um espaço preenchido pela ação de DNA-polimerases e ligases.
- Alguns danos ao DNA são reparados por reversão direta da reação que causou o dano: dímeros de pirimidina são diretamente convertidos a pirimidinas monoméricas por uma fotoliase, e o grupo metil de $O^6$-metilguanina é removido por uma metiltransferase.
- Em bactérias, a síntese de DNA translesão propensa a erro, envolvendo DNA-polimerases TLS, ocorre em resposta a um dano muito grande ao DNA. Em eucariontes, polimerases semelhantes têm funções especializadas no reparo do DNA que minimizam a introdução de mutações.

## 25.3 Recombinação do DNA

O rearranjo da informação genética no interior e entre as moléculas de DNA envolve vários processos, coletivamente colocados sob o título de recombinação genética. As aplicações práticas dos rearranjos de DNA na alteração dos genomas de um número crescente de organismos estão agora sendo exploradas (Capítulo 9).

Os eventos de recombinação genética caem em pelo menos três grandes classes. A **recombinação genética homóloga** (também chamada recombinação geral) envolve alterações genéticas entre duas moléculas de DNA quaisquer (ou segmentos da mesma molécula) que compartilham uma região estendida de sequência praticamente idêntica. A sequência real de bases é irrelevante, desde que seja semelhante nos dois DNA. Na **recombinação sítio-específica** as trocas ocorrem apenas em uma sequência *particular* do DNA. A **transposição de DNA** é diferente das outras duas classes porque geralmente envolve um segmento curto de DNA com a capacidade marcante para se mover de uma localização no cromossomo para outra. Esses "genes saltadores" (*jumping genes*) foram inicialmente observados no milho na década de 1940 por Barbara

Barbara McClintock, 1902–1992

McClintock. Além disso, existe uma ampla gama de rearranjos genéticos incomuns para os quais ainda não foi proposto nenhum mecanismo ou propósito. Aqui serão focalizadas as três classes gerais.

As funções dos sistemas de recombinação genética são tantas quanto os seus mecanismos. Elas incluem papéis em sistemas de reparo de DNA especializados, atividades especializadas na replicação do DNA, regulação da expressão de certos genes, facilitação da segregação adequada de cromossomos durante a divisão celular eucariótica, manutenção da diversidade genética e implementação de rearranjos genéticos programados durante o desenvolvimento embrionário. Na maior parte dos casos, a recombinação genética está intimamente integrada a outros processos no metabolismo do DNA, e isso se torna um tema da presente discussão.

## A recombinação homóloga bacteriana é uma função de reparo do DNA

Em bactérias, a recombinação genética homóloga é principalmente um processo de reparo do DNA e, nesse contexto (como observado na Seção 25.2) é denominado de **reparo do DNA recombinante**. Ele é geralmente direcionado para a reconstrução das forquilhas de replicação que pararam ou colapsaram no local do dano do DNA. A recombinação genética homóloga também pode ocorrer durante a conjugação (*mating*), quando o DNA cromossômico é transferido de uma célula bacteriana (doadora) para outra (recipiente). A recombinação durante a conjugação, embora rara em populações bacterianas selvagens, contribui para a diversidade genética.

Um exemplo do que ocorre quando uma forquilha de replicação encontra um dano no DNA é mostrado na **Figu-**

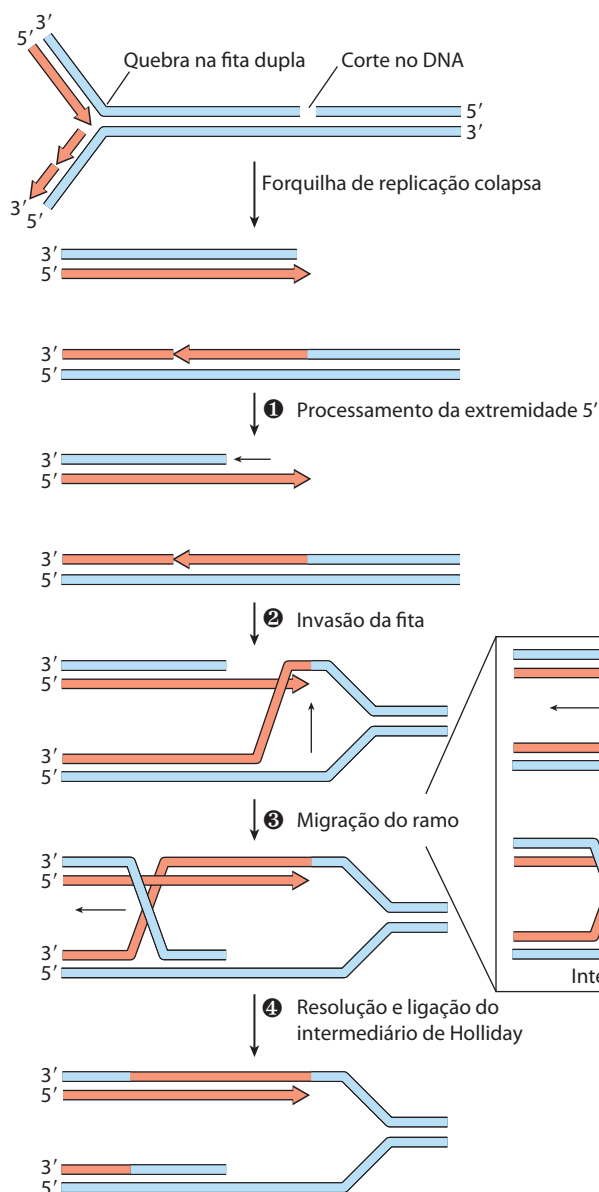



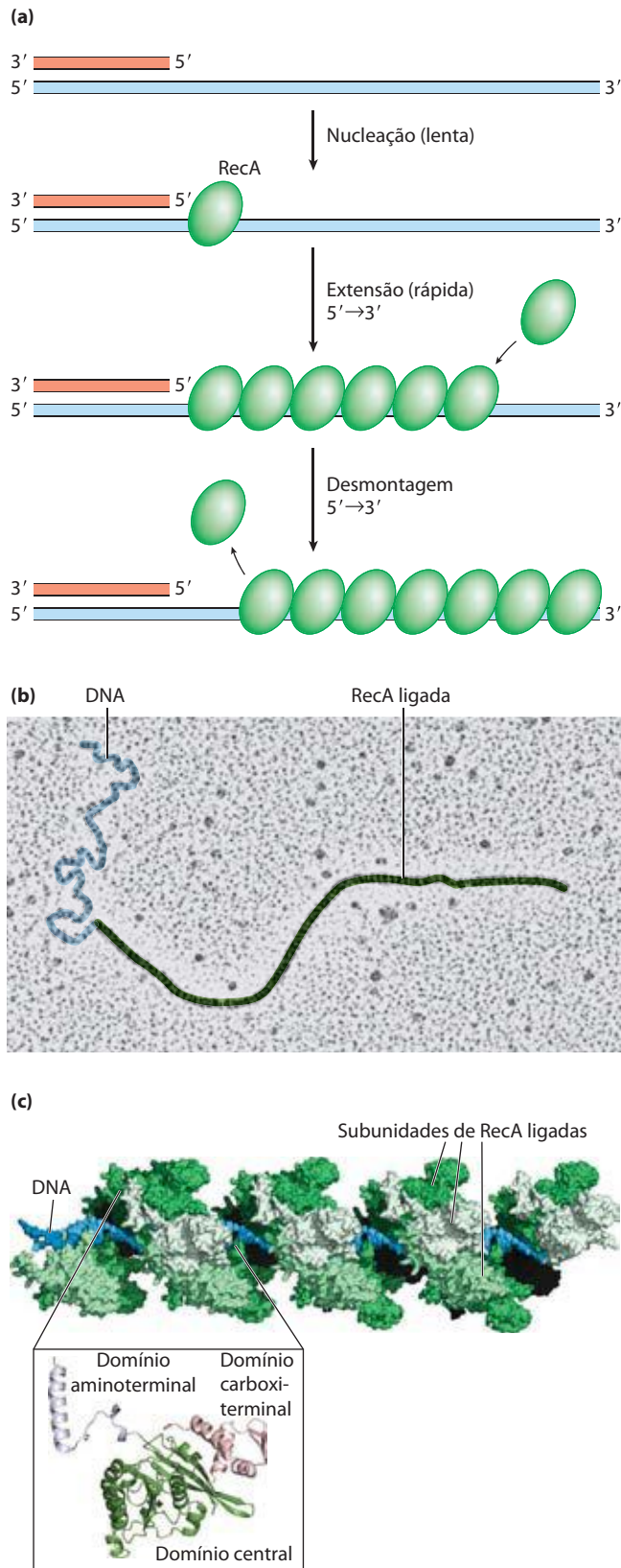
**FIGURA 25-30 Reparo de DNA recombinante em uma forquilha de replicação colapsada.** Quando uma forquilha de replicação encontra uma quebra em uma das fitas-molde, um braço da forquilha é perdido e a forquilha de replicação colapsa. A extremidade 5′ da fita no corte é degradada para criar uma extensão 3′ de fita simples, então usada em um processo de invasão da fita, pareando a fita única invasora com sua fita complementar no interior do duplex adjacente. A migração do ramo (inserção) pode criar um intermediário de Holliday. A clivagem desse intermediário por nucleases especializadas, seguida por ligação, restaura uma forquilha de replicação viável. O replissomo é carregado sobre essa estrutura (não mostrado) e a replicação continua. As pontas das setas representam extremidades 3′.

**ra 25-30**. Uma característica comum das vias de reparo do DNA ilustradas nas Figuras 25-22 a 25-25 é que elas introduzem uma quebra transitória em uma das fitas de DNA. Se uma forquilha de replicação encontra um local danificado em reparo próximo a uma quebra em uma das fitas-molde, um braço da forquilha de replicação é desconectado por uma quebra de fita dupla e a forquilha colapsa. A extremidade dessa quebra é processada pela degradação da extremidade 5′ da fita. A extensão da fita simples 3′ resultante é ligada por uma recombinase que a utiliza para promover a invasão da fita: a extremidade 3′ invade o DNA duplex intacto conectado ao outro braço da forquilha e se pareia com sua sequência complementar. Isso cria uma estrutura de DNA ramificada (um ponto onde três segmentos de DNA se juntam). O ramo de DNA pode ser movido em um processo denominado **migração do ramo** para criar uma estrutura cruzada semelhante a um X, conhecida como **intermediário de Holliday**, em homenagem ao pesquisador Robin Holliday, que primeiro postulou sua existência. O intermediário de Holliday é, então, resolvido por uma classe especial de nucleases. O processo todo reconstrói a forquilha de replicação.

Em *E. coli*, o processo de terminação do DNA é promovido pela nuclease/helicase RecBCD. A enzima RecBCD se liga ao DNA linear em uma extremidade livre (quebrada) e se move para dentro ao longo da dupla-hélice, desenrolando e degradando o DNA em uma reação acoplada à hidrólise do ATP (**Figura 25-31**). As subunidades RecB e RecD são motores de helicase, com a RecB se movendo na direção 3′→5′ ao longo de uma fita e a RecD se movendo na direção 5′→3′ ao longo da outra fita. A atividade da enzima é alterada quando ela interage com uma sequência denominada **chi**, (5′)GCTGGTGG, que se liga fortemente a um sítio na subunidade RecC. A partir desse ponto, a degradação da fita com a terminação 3′ é muito reduzida, mas a degradação da fita 5′ terminal aumenta. Esse processo cria um DNA de fita simples com uma extremidade 3′, que é utilizado durante as etapas subsequentes na recombinação. As 1.009 sequências chi espalhadas por todo o genoma de *E. coli* potencializam a frequência de recombinação em cerca de 5 a 10 vezes no interior de 1.000 pb do sítio chi. A potencialização diminui com o aumento da distância do sítio chi. Sequências que potencializam a frequência de recombinação também foram identificadas em vários outros organismos.

A recombinase bacteriana é a proteína RecA. Ela é incomum entre as proteínas de metabolismo do DNA porque sua forma ativa é um filamento helicoidal ordenado de até vários milhares de subunidades que se reúnem cooperati-

**FIGURA 25-31 A helicase/nuclease RecBCD. (a)** Visão em corte da estrutura da enzima RecBCD enquanto ela é ligada ao DNA (PDB ID 1W36). As subunidades são mostradas em diferentes cores, com o DNA entrando na estrutura na esquerda e as fitas de DNA desenrolado (não é parte da estrutura resolvida) são modeladas saindo para a direita. Uma estrutura proteica bulbosa chamada pino, parte da subunidade RecC, facilita a separação das fitas. **(b)** Atividades da enzima RecBCD em uma extremidade de DNA. As subunidades RecB e RecD são helicases, motores moleculares que impulsionam o complexo ao longo do DNA, um processo que precisa de ATP; a RecB degrada ambas as fitas à medida que o complexo se desloca, clivando a extremidade 3′ da fita mais frequentemente do que a extremidade 5′ da fita. Quando um sítio chi é encontrado na extremidade da fita 3′, a subunidade RecC se liga a ele, parando o avanço dessa fita através do complexo. A extremidade 5′ da fita continua a ser degradada à medida que a extremidade 3′ da fita forma uma volta para fora, criando, por fim, uma extensão 3′ da fita simples. A proteína RecA (não mostrada) é finalmente carregada sobre o DNA processado pela enzima RecBCD.

vamente no DNA (**Figura 25-32**). Esse filamento em geral forma um DNA de fita simples, tal como o produzido pela enzima RecBCD. Sua formação não é tão direta como mostrado na Figura 25-32, uma vez que a proteína ligadora da fita simples de DNA (SSB) está normalmente presente e impede especificamente a ligação das primeiras poucas subunidades ao DNA (nucleação do filamento). A enzima RecBCD age diretamente como uma carregadora de RecA, facilitando a nucleação de um filamento de RecA na fita simples de DNA revestida por SSB. Os filamentos se montam e desmontam na direção 5′→3′. Muitas outras proteínas bacterianas regulam a formação e desmontagem de filamentos de RecA. A proteína RecA promove as etapas centrais da recombinação homóloga, incluindo a etapa de invasão da fita de DNA da Figura 25-31 e várias outras reações de troca de fitas *in vitro*.

Após a invasão da fita, a migração do ramo é promovida por um complexo denominado RuvAB (**Figura 25-33a**). Uma vez que um intermediário de Holliday tenha sido criado, ele pode ser clivado por nucleases especializadas denominadas RuvC (Figura 25-33b), e cortes são selados com DNA-ligase. Uma estrutura de forquilha de replicação viável é, então, reconstruída, como destacado na Figura 25-31.

Depois que as etapas de recombinação estão completas, as forquilhas de replicação se reconstroem em um processo denominado **reinício da replicação independente de origem**. Quatro proteínas (PriA, PriB, PriC e DnaT) interagem com DnaC para carregar a DnaB helicase para a forquilha de replicação reconstruída. A DnaG primase, então, sintetiza um iniciador de RNA, e a DNA-polimerase se reconstrói na DnaB para reiniciar a síntese do DNA. Originalmente descoberto como um componente necessário para a replicação do DNA do $\phi$X174 *in vitro*, um complexo de PriA, PriB, PriC e DnaT, em conjunto com DnaB, DnaC e DnaG, é agora denominado de **primossomo de reinício da replicação**. O reinício da forquilha de replicação também necessita da DNA-polimerase II, em um papel ainda não definido; essa atividade de polimerase II dá lugar à atividade da DNA-polimerase III para a extensa replicação geralmente necessária para completar o cromossomo. Desse modo, o processo de recombinação é fortemente interligado à replicação. Um processo do metabolismo do DNA apoia o outro.

## A recombinação eucariótica homóloga é necessária para a segregação adequada de cromossomos durante a meiose

Em eucariontes, a recombinação genética homóloga pode ter várias funções na replicação e divisão celular, incluindo o reparo das forquilhas de replicação paradas. A recombinação ocorre com a mais alta frequência durante a **meiose**,

**FIGURA 25-32** **Filamentos da proteína RecA.** A RecA e outras recombinases nessa classe funcionam como filamentos de nucleoproteína. **(a)** A formação do filamento prossegue nas etapas de nucleação discreta e extensão. A nucleação é a adição das poucas primeiras subunidades de RecA. A extensão ocorre pela adição de subunidades de RecA de modo que o filamento cresce na direção 5′→3′. Quando ocorre a desmontagem, as subunidades são retiradas da extremidade traseira. **(b)** Eletromicrografia colorizada de um filamento de RecA ligado ao DNA. **(c)** Segmento de um filamento de RecA com quatro voltas em hélices (24 subunidades de RecA; derivadas de PDB ID 3CMX). Observe o DNA de fita dupla ligado no centro. O domínio central da RecA é estruturalmente relacionado aos domínios das helicases.

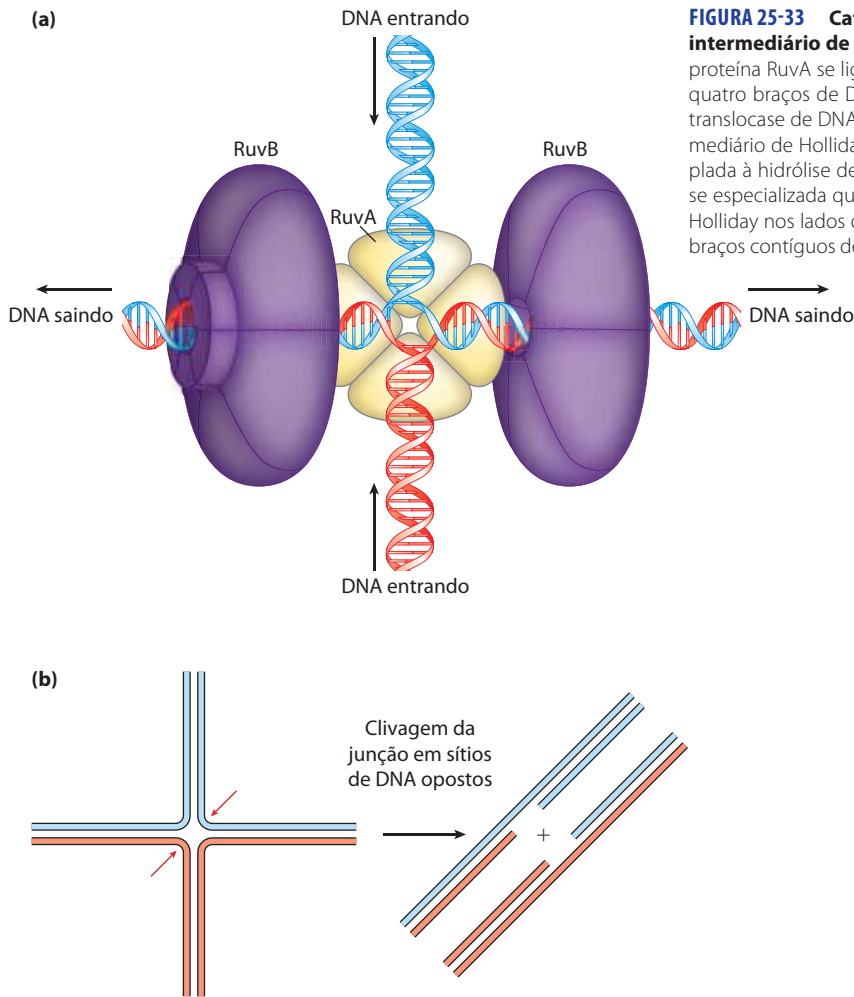



**FIGURA 25-33 Catálise da migração do ramo de DNA e resolução do intermediário de Holliday pelas proteínas RuvA, RuvB e RuvC. (a)** A proteína RuvA se liga diretamente a um intermediário de Holliday onde os quatro braços de DNA se encontram. A proteína hexamérica RuvB é uma translocase de DNA. Dois hexâmeros se ligam aos braços opostos do intermediário de Holliday e impulsionam o DNA para fora em uma reação acoplada à hidrólise de ATP. Então o ramo se move. **(b)** A RuvC é uma nuclease especializada que se liga ao complexo RuvAB e cliva o intermediário de Holliday nos lados opostos da junção (setas vermelhas), de modo que dois braços contíguos de DNA permanecem em cada produto.

o processo pelo qual as células germinativas diploides com dois conjuntos de cromossomos se dividem para produzir gametas haploides (espermatozoides ou óvulos) em animais (esporos haploides em plantas) – cada gameta possuindo apenas um membro de cada par de cromossomos (**Figura 25-34**). A meiose começa com a replicação do DNA nas células germinativas, de modo que cada molécula de DNA esteja presente em quatro cópias. Cada conjunto de quatro cromossomos homólogos (tétrade) existe como dois pares de cromátides-irmãs, e as cromátides-filhas permanecem associadas nos seus centrômeros. A célula, então, passa por dois ciclos de divisão celular sem uma etapa de replicação do DNA. Na primeira divisão celular, os dois pares de cromátides-irmãs são segregados em células-filhas. Na segunda divisão celular, os dois cromossomos em cada par de cromátides-filhas são segregados em células-filhas novas. Em cada divisão, os cromossomos a serem segregados são levados para as células-filhas pelas fibras do fuso presas a polos opostos da célula em divisão. As duas divisões sucessivas reduzem o conteúdo do DNA ao nível haploide em cada gameta. A segregação adequada de cromossomos para as células-filhas demanda a existência de ligações físicas entre cromossomos homólogos para ser segregada. À medida que as fibras do fuso se prendem aos centrômeros dos cromossomos e começam a puxar, as ligações entre cromossomos homólogos criam uma tensão. Essa tensão, sentida por mecanismos celulares ainda não compreendidos, sinaliza que esse par de cromossomos ou cromátides-irmãs está adequadamente alinhado para a segregação. Uma vez que a tensão é percebida, as ligações gradualmente se dissolvem e a segregação prossegue. Quando ocorre uma ligação inadequada da fibra ao fuso (p. ex., se os centrômeros de um par de cromossomos estão ligados ao mesmo polo celular), uma cinase celular percebe a ausência de tensão e ativa um sistema que remove as ligações do fuso, permitindo que a célula tente novamente.

Durante a segunda divisão meiótica, as ligações centroméricas entre as cromátides-irmãs, ampliadas por coesinas depositadas durante a replicação (ver Figura 24-34), fornecem as ligações físicas necessárias para guiar a segregação. Entretanto, durante a primeira divisão celular meiótica, os dois pares de cromátides-irmãs que serão segregados não estão relacionados a um evento de replicação recente e não são ligados por coesinas ou por qualquer outra associação física. Ao contrário, os pares homólogos de cromátides-irmãs são alinhados e novas ligações são criadas por recombinação, um processo que envolve a quebra e religação do DNA (**Figura 25-35**). Essa troca, também chamada de entre-

**FIGURA 25-34 Meiose em células de linhagem germinativa em animais.** Os cromossomos de uma célula de linhagem germinativa diploide hipotética (quatro cromossomos; dois pares homólogos) replicam e são mantidos juntos pelos seus centrômeros. Cada molécula de DNA de fita dupla replicada é chamada de cromátide (cromátide-irmã). Na prófase I, logo antes da primeira divisão meiótica, os dois conjuntos homólogos de cromátides se alinham para formar tétrades, mantidas juntas por ligações covalentes nas junções homólogas (quiasmas). As trocas cruzadas ocorrem no interior dos quiasmas (ver Figura 25-35). Essas associações transitórias entre homólogos garantem que dois cromossomos presos se separem adequadamente na próxima etapa, quando as fibras do fuso presas os puxam para polos opostos da célula em divisão na primeira divisão meiótica. Os produtos dessa divisão são duas células-filhas cada uma com dois pares de cromátides-irmãs diferentes. Os pares agora se alinham ao longo do equador da célula em preparação para a separação das cromátides (agora chamadas cromossomos). A segunda divisão meiótica produz quatro células-filhas haploides que podem servir como gametas. Cada uma tem dois cromossomos, metade do número da célula diploide da linhagem germinativa. Os cromossomos foram reorganizados e recombinados.

cruzamento, pode ser observada com o microscópio óptico. O entrecruzamento liga os dois pares de cromátides-irmãs juntos em pontos denominados quiasmas. Também durante as permutas, o material genético é trocado entre os pares de cromátides-irmãs. Essas trocas também aumentam a diversidade genética nos gametas resultantes. A importância da recombinação meiótica para a segregação cromossômica adequada é bem ilustrada pelas consequências fisiológicas e sociais de suas falhas (Quadro 25-2).

O entrecruzamento não é um processo totalmente aleatório, e *hot spots* têm sido identificados em muitos cromossomos eucarióticos. Entretanto, a suposição de que o entrecruzamento possa ocorrer com a mesma probabilidade em quase todos os pontos ao longo do comprimento de dois cromossomos homólogos continua a ser uma aproximação razoável em muitos casos, e é esta suposição que permite o mapeamento genético dos genes em um cromossomo específico. A frequência de recombinações homólogas em qualquer região que separa dois pontos em um cromossomo é grosso modo proporcional à distância entre dois pontos, e isso permite a determinação das posições relativas e das distâncias entre genes diferentes. A distribuição independente dos genes não ligados em cromossomos diferentes (**Figura 25-36**) faz outra importante contribuição para a diversidade genética dos gametas. Essas realidades genéticas orientam muitas das modernas aplicações da genômica, tais como a definição de haplótipos (ver Figura 9-30) ou a pesquisa para genes de doenças no genoma humano (ver Figura 9-34).

A recombinação homóloga tem, portanto, pelo menos três funções identificáveis em eucariontes: (1) contribui para o reparo de vários tipos de dano ao DNA; (2) fornece, nas células eucarióticas, uma ligação física transitória entre cromátides que promovem a segregação ordenada de cromossomos na primeira divisão celular meiótica; e (3) potencializa a diversidade genética em uma população.

## A recombinação durante a meiose se inicia com quebras na fita dupla

Uma via provável para a recombinação homóloga durante a meiose é destacada na Figura 25-35a. O modelo tem quatro características-chave. Primeiro, os cromossomos homólogos são alinhados. Segundo, uma quebra na dupla fita da molécula de DNA é criada e, então, as extremidades expostas são processadas por uma exonuclease, deixando uma extensão de fita simples com um grupo 3′-hidroxila na extremidade quebrada (etapa ❶). Terceiro, as extremidades expostas 3′ invadem o DNA duplex intacto do homólogo e isso é seguido pela migração de ramos e/ou replicação para

(a)
Gene
A
Gene
B
5′
3′
5′
3′
3′
5′
3′
5′
❶ Uma quebra na fita dupla em um ou dois homólogos é convertida em um intervalo na fita dupla pela ação das exonucleases. As fitas com extremidades 3′ são degradadas menos do que aquelas com extremidades 5′, produzindo extensões de fita simples 3′.
❷ Uma extremidade 3′ exposta pareia com seu complemento no homólogo intacto. A outra fita do duplex é deslocada.
❸ A extremidade 3′ invasora é estendida pela DNA-polimerase mais a migração do ramo, após um evento de captura da segunda extremidade, gerando uma molécula de DNA com duas permutas na forma de estruturas ramificadas chamadas de intermediários de Holliday.
❹ A replicação adicional do DNA substituiu o DNA ausente do sítio da quebra original da fita dupla.
❺ Nucleases especializadas chamadas de resolvases dos intermediários de Holliday clivam esse intermediário gerando um de dois produtos de recombinação. No produto do conjunto 2, o DNA de qualquer um dos lados da região que sofre reparo é recombinado.
Produto do conjunto 1
Produto do conjunto 2
(b)
(c)
Leptóteno
Zigóteno
Paquíteno
Quiasmas
Diplóteno

**FIGURA 25-35 Recombinação durante a prófase I na meiose. (a)** Modelo do reparo de quebra da fita dupla para recombinação genética homóloga. Os dois cromossomos homólogos (um mostrado em cor salmão, o outro em azul) envolvidos nesse evento de recombinação têm sequências idênticas ou quase idênticas. Cada um dos dois genes mostrados tem diferentes alelos nos dois cromossomos. As etapas são descritas no texto. **(b)** O entrecruzamento ocorre durante a prófase da meiose I. Os vários estágios da prófase I estão alinhados com os processos de recombinação que estão ocorrendo na parte (a). As quebras de fita dupla são introduzidas e processadas no estágio de leptóteno. A invasão da fita e a conclusão do entrecruzamento ocorrem mais tarde. À medida que as sequências homólogas nos dois pares de cromátides-irmãs são alinhadas no estágio de zigóteno, se formam os complexos sinaptonemais e ocorre a invasão da fita. Os cromossomos homólogos são fortemente alinhados no estágio de paquíteno. **(c)** Cromossomos homólogos de um gafanhoto são vistos em sucessivos estágios da prófase I meiótica. Os quiasmas se tornam visíveis no estágio de diplóteno.

## QUADRO 25-2  MEDICINA Por que a segregação adequada de cromossomos é importante

Quando o alinhamento cromossômico e a recombinação não são corretos e completos na meiose I, a segregação dos cromossomos pode dar errado. Um resultado pode ser a aneuploidia, uma condição na qual uma célula tem o número errado de cromossomos. Os produtos haploides da meiose (gametas ou esporos) podem não ter cópias ou ter duas cópias de um cromossomo. Quando um gameta com duas cópias de um cromossomo se junta com um gameta com uma cópia de um cromossomo durante a fertilização, as células no embrião resultante têm três cópias daquele cromossomo (eles são trissômicos).

Em *S. cerevisiae*, a aneuploidia resultante de erros na meiose ocorre em uma taxa de 1 em cada 10.000 eventos meióticos. Em moscas-das-frutas, a taxa é de cerca de 1 em uns poucos milhares. Taxas de aneuploidia em mamíferos são consideravelmente mais altas. Em camundongos, a taxa é de 1 em 100, e é maior ainda em outros mamíferos. A taxa de aneuploidia em óvulos humanos fertilizados é estimada em 10 a 30%; a maioria dessas células aneuploides é monossômica (elas têm uma única cópia de um cromossomo) ou trissômica. É quase certo que essa taxa seja uma subestimação. A maior parte das trissomias é letal e várias resultam em aborto bem antes que a gravidez seja detectada. A aneuploidia é a principal causa de perda de gravidez. Os poucos fetos trissômicos que sobrevivem ao nascimento geralmente têm três cópias dos cromossomos 13, 18, ou 21 (a trissomia do 21 é a síndrome de Down). Complementos anormais dos cromossomos sexuais também são encontrados na população humana. Quase todas as monossomias são fatais no estágio inicial do desenvolvimento fetal. As consequências sociais da aneuploidia em humanos são consideráveis. A aneuploidia é a principal causa genética de deficiências mentais e de desenvolvimento. No centro dessas taxas elevadas está uma característica da meiose em fêmeas de mamíferos que tem um significado especial para os humanos.

Em seres humanos do sexo masculino, as células germinativas iniciam a meiose na puberdade, e cada evento meiótico necessita de um tempo relativamente curto. Em contraste, a meiose nas células germinativas das mulheres é um processo muito prolongado. A produção de um óvulo começa antes do nascimento da fêmea – com o início da meiose no feto, com 12 a 13 semanas de gestação. A meiose se inicia em todas as células germinativas em desenvolvimento em um período de poucas semanas. As células prosseguem por grande parte da meiose I. Os cromossomos se alinham e geram permutas, continuando um pouco além da fase de paquíteno (ver Figura 25-35) – e, então, o processo cessa. Os cromossomos entram em uma fase estacionária chamada de estágio dictiático, com os cruzamentos posicionados, uma espécie de animação suspensa onde eles permanecem à medida que a fêmea amadurece – geralmente de 13 a 50 anos. Apenas na maturidade sexual é que as células germinativas individuais continuam por meio de duas divisões celulares meióticas para produzir óvulos.

Entre o início do estágio dictiático e a conclusão final da meiose, alguma coisa pode acontecer que interrompe ou danifica os cromossomos homólogos ligados nas células germinativas. Com o aumento da idade da mulher, a taxa de trissomia nos óvulos que ela produz aumenta consideravelmente com a chegada da menopausa (Figura Q-1). Há muitas hipóteses para explicar isso, e vários fatores diferentes podem desempenhar um papel. Entretanto, a maioria das hipóteses está centrada nas trocas por recombinação na meiose I e sua estabilidade durante o estágio dictiático prolongado.

Ainda não está claro que etapas médicas poderiam ser tomadas para reduzir a incidência de aneuploidias em fêmeas em idade fértil. O que é conhecido é a importância inerente da recombinação e da geração de permutas na meiose humana.

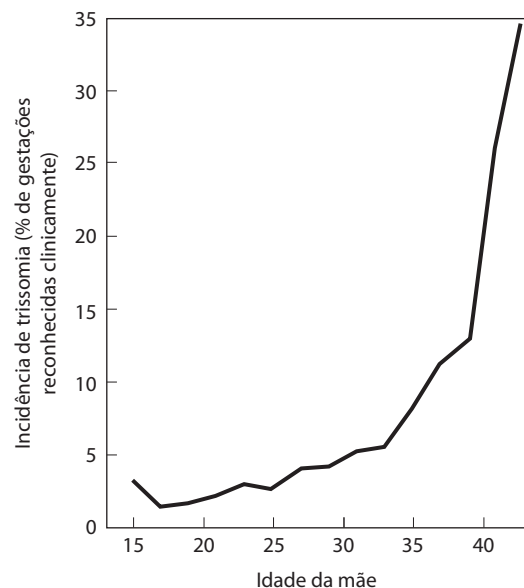



**FIGURA Q-1** Incidência cada vez maior da trissomia humana com o aumento da idade da mãe.

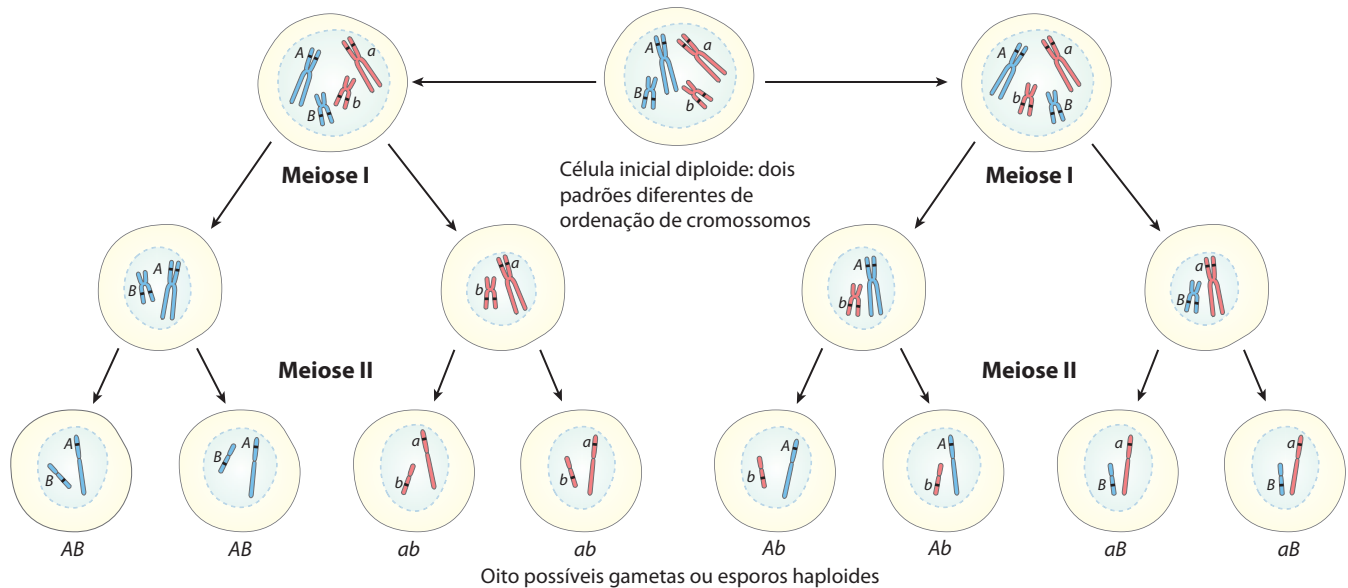



**FIGURA 25-36 A contribuição do arranjo independente para a diversidade genética.** Nesse exemplo os cromossomos já foram replicados para criar dois pares de cromátides-irmãs para dois cromossomos. Azul e cor salmão distinguem as cromátides-irmãs de cada par. Um gene em cada cromossomo é destacado, com diferentes alelos (A ou a, B ou b) nos homólogos. A ordenação independente pode levar a gametas com qualquer combinação de alelos presente nos dois cromossomos diferentes. O entrecruzamento (não mostrado aqui, ver Figura 25-34) também contribuiria para a diversidade genética em uma típica sequência meiótica.

criar um par de intermediários de Holliday (etapas ❷ a ❹). Quarto, a clivagem de duas permutas cria qualquer um dos dois pares de produtos recombinantes completos (etapa ❺). Observe a semelhança dessas etapas em relação aos processos de reparo bacteriano por recombinação destacados na Figura 25-30.

Nesse **modelo de reparo da quebra da fita dupla** para recombinação, as extremidades 3′ são utilizadas para iniciar a troca genética. Uma vez pareada com a fita complementar no homólogo intacto, é criada uma região do DNA híbrido que contém fitas complementares de dois DNAs parentais diferentes (o produto da etapa ❷ na Figura 25-35a). Cada uma das extremidades 3′ pode, então, agir como um iniciador para a replicação do DNA. A recombinação meiótica dos homólogos pode variar em muitos detalhes de uma espécie para outra, mas a maior parte das etapas destacadas antes está geralmente presente em alguma forma. Há dois modos para clivar ou "resolver" o intermediário de Holliday com uma nuclease semelhante à RuvC de modo que os dois produtos contenham genes na mesma ordem linear que nos substratos – os cromossomos originais e não recombinados (etapa ❺). Se clivado de uma forma, o DNA lateral à região que contém o DNA híbrido não é recombinado; se clivado do outro modo, o DNA lateral é recombinado. Ambos os resultados são observados *in vivo*.

A recombinação homóloga ilustrada na Figura 25-35 é um processo muito elaborado, essencial para a segregação precisa do cromossomo. Suas consequências moleculares para a geração da diversidade genética são sutis. Para compreender como esse processo contribui para a diversidade, deve-se ter em mente que os dois cromossomos homólogos que sofrem recombinação não são necessariamente *idênticos.* O arranjo linear dos genes pode ser o mesmo, mas as sequências de bases em alguns dos genes podem ser um pouco diferentes (em alelos diferentes). Em um humano, por exemplo, um cromossomo pode conter o alelo para hemoglobina A (hemoglobina normal) enquanto o outro contém o alelo para hemoglobina S (a mutação da célula falciforme). A diferença pode consistir em não mais do que um par de bases em milhões. A recombinação homóloga não modifica o arranjo linear dos genes, mas pode determinar que alelos se ligaram em um único cromossomo e, portanto, foram passados juntos para a próxima geração. A ordenação independente de cromossomos diferentes (Figura 25-36) determina que alelos gênicos de diferentes cromossomos são herdados juntos.

## A recombinação sítio-específica resulta em rearranjos de DNA precisos

A recombinação genética de homólogos, o tipo discutido até agora, pode envolver duas sequências homólogas quaisquer. O segundo tipo geral de recombinação, a recombinação sítio-específica, é um tipo muito diferente de processo: a recombinação é limitada a sequências específicas. Reações de recombinação desse tipo ocorrem praticamente em cada célula, ocupando funções especializadas que variam muito de uma espécie para outra. Exemplos incluem a regulação da expressão de alguns genes e a promoção de rearranjos de DNA programados no desenvolvimento embrionário ou nos ciclos de replicação de alguns DNAs virais e de plasmídeos. Cada sistema de recombinação sítio-específico consiste em uma enzima denominada recombinase e em uma sequência de DNA única e curta (20 a 200 pb), onde a recombinase age

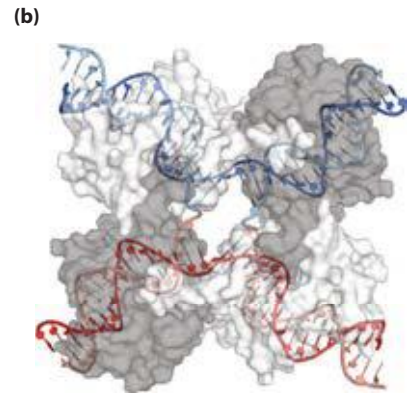
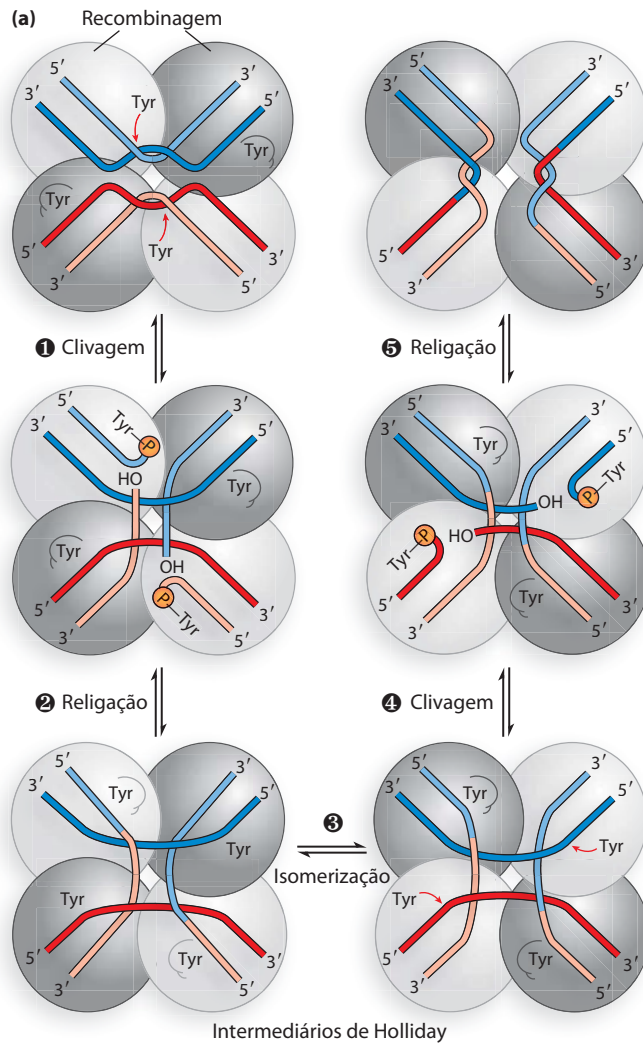



**FIGURA 25-37 Uma reação de recombinação sítio-específica. (a)** A reação mostrada aqui é para uma classe comum de recombinases sítio-específicas chamadas de recombinases da classe das integrases (nomeadas a partir da integrase do bacteriófago λ, a primeira recombinase caracterizada. Essas enzimas usam resíduos de Tyr como nucleófilos no sítio ativo. A reação é levada a cabo no interior de um tetrâmero de subunidades idênticas. As subunidades de recombinase se ligam a uma sequência específica, o sítio de recombinação. ❶ Uma fita em cada DNA é clivada em pontos particulares na sequência. O nucleófilo é o grupo –OH de um sítio ativo do resíduo Tyr, e o produto é uma ligação de fosfotirosina covalente entre a proteína e o DNA. ❷ Depois da isomerização ❸, as fitas clivadas se ligam a novos parceiros, produzindo um intermediário de Holliday. As etapas ❹ e ❺ completam a reação por um processo semelhante às primeiras duas etapas. A sequência original do sítio de recombinação é regenerada depois de recombinar o DNA que flanqueia o sítio. Estas etapas ocorrem no interior de um complexo de múltiplas subunidades de recombinase que algumas vezes incluem outras proteínas não mostradas aqui. **(b)** Modelo de contorno de superfície de uma recombinase de quatro subunidades da classe das integrases chamado de recombinase Cre, ligada a um intermediário de Holliday (mostrado com fitas em hélice azul-claro e azul-escuro). A proteína foi tornada transparente de modo que o DNA ligado é visível (derivado do PDB ID 3CRX). Outro grupo de recombinases, chamadas de família resolvase/invertase, usa um resíduo de Ser como um nucleófilo no sítio ativo.

(o sítio de recombinação). Uma ou mais proteínas auxiliares podem regular o tempo ou o resultado da reação.

Há duas classes gerais de sistemas de recombinação sítio-específicos, que dependem ou de resíduos Tyr ou de resíduos Ser no sítio ativo. Estudos *in vitro* de muitos sistemas de recombinação sítio-específicos na classe tirosina elucidaram alguns princípios gerais, incluindo a via de reação fundamental (**Figura 25-37a**). Várias dessas enzimas foram cristalizadas, revelando detalhes estruturais da reação. Uma recombinase separada reconhece e se liga a cada um dos dois sítios de recombinação em duas moléculas diferentes de DNA ou no interior do mesmo DNA. Uma fita de DNA de cada sítio é clivada em um ponto específico no interior do sítio, e a recombinase se torna ligada covalentemente ao DNA no sítio de clivagem por meio de uma ligação de fosfotirosina (etapa ❶). A ligação proteína-DNA transitória preserva a ligação fosfodiéster que é perdida na clivagem do DNA, de modo que cofatores de alta energia, como o ATP, são desnecessários nas etapas seguintes. As fitas de DNA clivadas são religadas a novos parceiros para formar um intermediário de Holliday, com novas ligações fosfodiéster criadas à custa da ligação proteína-DNA (etapa ❷). Uma isomerização, então, ocorre (etapa ❸), e o processo é repetido em um segundo ponto no interior de cada um dos dois sítios de recombinação (etapas ❹ e ❺). Nos sistemas que empregam um resíduo Ser de sítio ativo, ambas as fitas de cada sítio de recombinação são cortadas concomitantemente e religadas aos novos parceiros sem o intermediário de Holliday. Em ambos os tipos de sistemas, a troca é sempre recíproca e precisa, regenerando os sítios de recombinação quando a reação está completa. É possível ver uma recombinase como uma endonuclease e uma ligase sítio-específica em um único pacote.

As sequências dos sítios de recombinação reconhecidas pelas recombinases sítio-específicas são parcialmente assimétricas (não palindrômicas), e os dois sítios de recombinação se alinham na mesma direção durante a reação da recombinase. O resultado depende da orientação e localização dos sítios de recombinação (**Figura 25-38**). Se os dois sítios estiverem na mesma molécula de DNA, a reação ou inverte ou exclui o DNA interveniente, determinada pelo fato de os sítios de recombinação apresentarem direção

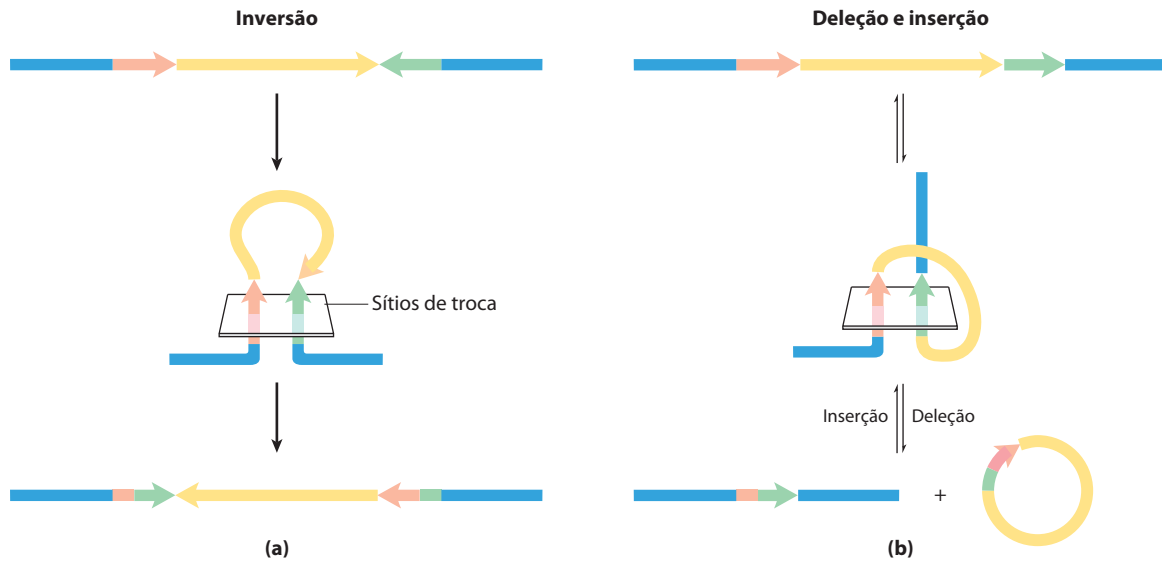
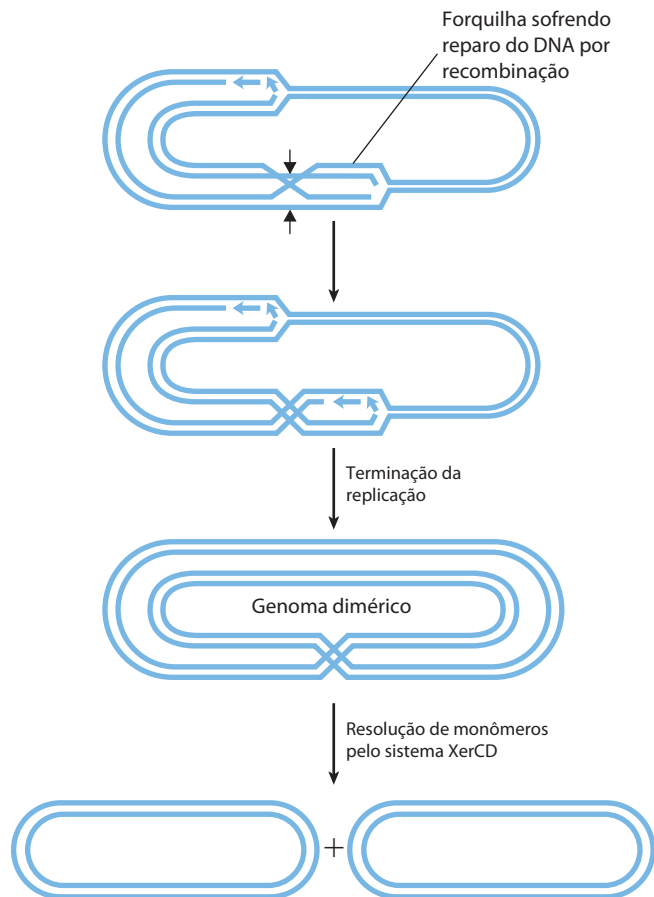



**FIGURA 25-38 Efeitos da recombinação sítio-específica.** O resultado da recombinação sítio-específica depende da localização e orientação dos sítios de recombinação (vermelho e verde) em uma molécula de fita dupla de DNA. A orientação aqui (mostrada pelas pontas das setas) se refere à ordem dos nucleotídeos no sítio de recombinação, não à direção 5′⟶3′. **(a)** Sítios de recombinação com orientação oposta na mesma molécula de DNA. O resultado é uma inversão. **(b)** Sítios de recombinação com a mesma orientação, tanto em uma molécula de DNA, produzindo uma deleção, quanto em duas moléculas de DNA, produzindo uma inserção.

oposta ou a mesma direção, respectivamente. Se os sítios estão em DNAs diferentes, a recombinação é intermolecular; se um ou ambos os DNAs são circulares, o resultado é uma inserção. Alguns sistemas de recombinases são altamente específicos para um desses tipos de reações e agem apenas nos sítios com orientações específicas.

A replicação cromossômica completa pode necessitar da replicação sítio-específica. O reparo do DNA recombinante de um cromossomo bacteriano circular, embora essencial, algumas vezes gera subprodutos deletérios. A resolução de um intermediário de Holliday em uma forquilha de replicação por uma nuclease tal como a RuvC, seguida pelo encerramento da replicação, pode dar origem a um de dois produtos: os dois cromossomos monoméricos normais ou um cromossomo dimérico contíguo (**Figura 25-39**). No último caso, os cromossomos ligados covalentemente não podem ser segregados para células-filhas na divisão celular e as células divididas ficam "emperradas". Um sistema de recombinação sítio-específico especializado em *E. coli*, o sistema XerCD, converte os cromossomos diméricos em cromossomos monoméricos, de modo que a divisão celular prossiga. A reação é uma deleção sítio-específica (Figura 25-38b). Esse é outro exemplo da coordenação próxima entre os processos de recombinação do DNA e outros aspectos do metabolismo do DNA.

**FIGURA 25-39 Deleção do DNA para desfazer um efeito deletério do reparo de DNA por recombinação.** A resolução de um intermediário de Holliday durante o reparo de DNA por recombinação (se cortado nos pontos indicados pelas setas vermelhas) pode gerar um cromossomo dimérico contíguo. Uma recombinase sítio-específica especializada em *E. coli*, XerCD, converte o dímero em monômeros, permitindo o prosseguimento da segregação de cromossomos e da divisão celular.

## Elementos genéticos de transposição se movem de um local para outro

Agora será abordado o terceiro tipo geral de sistema de recombinação: a recombinação que permite o movimento de elementos de transposição ou **transposons**. Esses elementos do DNA, encontrados praticamente em todas as células, se movem ou "pulam" ("*jump*"), de um local no cromossomo (o sítio doador) para outro no mesmo ou em um cromossomo diferente (o sítio-alvo). Não é necessária uma sequência de DNA homóloga para esse movimento, denominado **transposição**; a nova localização é determinada mais ou menos aleatoriamente. A inserção de um transposon em um gene essencial poderia matar a célula, assim a transposição é fortemente regulada e normalmente muito infrequente. Os transposons são, talvez, o mais simples dos parasitas moleculares, adaptados para replicar passivamente dentro de cromossomos de células hospedeiras. Em alguns casos eles transportam genes úteis para a célula hospedeira e, portanto, existem em um tipo de simbiose com o hospedeiro.

As bactérias têm duas classes de transposons. As **sequências de inserção** (transposons simples) contêm apenas as sequências necessárias para a transposição e os genes para as proteínas (transposases) que promovem o processo. Os **transposons complexos** contêm um ou mais genes além daqueles necessários para a transposição. Esses genes extras podem, por exemplo, conferir resistência a antibióticos e, portanto, aumentar as chances de sobrevivência da célula hospedeira. A dispersão de elementos de resistência a antibióticos entre populações bacterianas causadoras de doenças, que está levando alguns antibióticos a não serem eficazes (p. 981), é mediada em parte, pela transposição. ■

Os transposons bacterianos variam em estrutura, mas a maioria tem sequências repetidas curtas em cada extremidade que funcionam como sítios de ligação para a transposase. Quando ocorre a transposição, uma sequência curta no sítio-alvo (5 a 10 pb) é duplicada para formar uma sequência repetitiva curta adicional que fica ao lado de cada extremidade do transposon inserido (**Figura 25-40**). Esses segmentos duplicados resultam do mecanismo de corte utilizado para inserir um transposon no DNA em uma nova localização.

Há duas vias gerais para a transposição em bactérias. Na transposição direta (ou simples) (**Figura 25-41**, esquerda), cortes de cada lado do transposon, o removem, e ele, então, se move para uma nova localização. Isso deixa uma quebra na fita dupla do DNA doador que deve ser reparada. No sítio-alvo, é feito um corte em degrau (como na Figura 25-40), o transposon é inserido na quebra e a replicação do DNA preenche os espaços para duplicar a sequência do sítio-alvo. Na transposição replicativa (Figura 25-41, direita), o transposon inteiro é replicado, deixando uma cópia para trás no local doador. Um **cointegrado** é um intermediário nesse processo, consistindo em uma região doadora covalentemente ligada ao DNA no sítio-alvo. Duas cópias completas do transposon estão presentes no cointegrado, ambas com a mesma orientação em relação ao DNA. Em alguns transposons bem caracterizados, o cointegrado intermediário é convertido em produtos pela recombinação sítio-específica, na qual recombinases especializadas promovem a reação de deleção necessária.

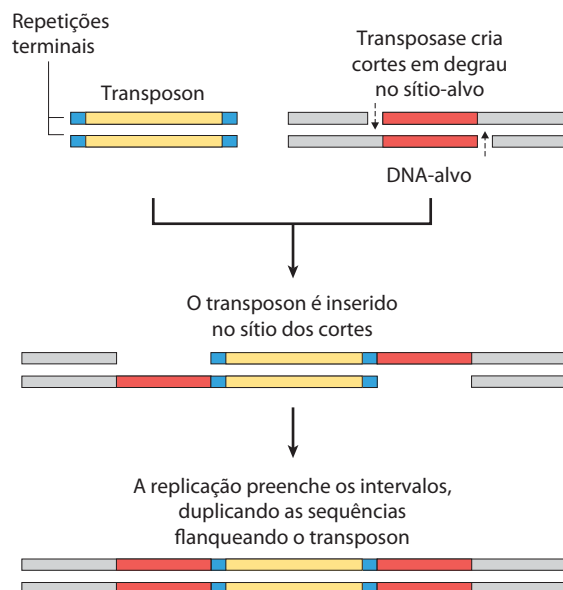



**FIGURA 25-40 Duplicação da sequência de DNA em um sítio-alvo quando um transposon é inserido.** As sequências que são duplicadas após a inserção de transposon são mostradas em vermelho. Essas sequências têm geralmente apenas algumas poucas bases de comprimento, e assim seu tamanho em relação àquele de um típico transposon é muito exagerado nesse desenho.

Os eucariontes também têm transposons, estruturalmente semelhantes aos transposons bacterianos, e alguns utilizam mecanismos de transposição semelhantes. Em outros casos, entretanto, o mecanismo de transposição parece envolver um RNA intermediário. A evolução desses transposons é interligada à evolução de algumas classes de vírus de RNA. Ambas são descritas no próximo capítulo.

## Os genes de imunoglobulinas se reúnem por recombinação

Alguns rearranjos de DNA são uma parte programada do desenvolvimento em organismos eucariontes. Um exemplo importante é a geração de genes completos de imunoglobulinas a partir de segmentos de genes separados em genomas de vertebrados. Um humano (como outros mamíferos) é capaz de produzir *milhões* de imunoglobulinas diferentes (anticorpos) com especificidades de ligação distintas, embora o genoma humano contenha apenas ~29.000 genes. A recombinação permite que um organismo produza uma diversidade extraordinária de anticorpos a partir de uma capacidade codificadora de DNA limitada. Estudos sobre o mecanismo de recombinação revelam uma relação próxima à transposição do DNA e sugerem que esse sistema para geração de diversidade de anticorpos pode ter evoluído a partir de uma invasão celular antiga de transposons.

**FIGURA 25-41** **Duas vias gerais para transposição: direta (simples) e replicativa.** ❶ O DNA é clivado primeiro de cada lado do transposon, nos sítios indicados pelas setas. ❷ Os grupos 3′ hidroxila liberados nas extremidades do transposon atuam como nucleófilos em um ataque direto sobre as ligações fosfodiéster no DNA-alvo. As ligações fosfodiéster alvo são em degrau (não diretamente em frente da outra) nas duas fitas de DNA. ❸ O transposon é agora ligado ao DNA-alvo. Na transposição direta (esquerda), a replicação preenche os intervalos em cada extremidade para completar o processo. Na transposição replicativa (direita), todo o transposon é replicado para criar um intermediário cointegrado. ❹ O cointegrado é frequentemente resolvido posteriormente, com o auxílio de um sistema de recombinação separado sítio-específico. O DNA hospedeiro clivado deixado para trás após a transposição direta é recuperado pela ligação das extremidades ou degradado (não mostrado). O último resultado pode ser letal para um organismo.

É possível utilizar os genes humanos que codificam proteínas da classe da imunoglobulina G (IgG) para ilustrar como a diversidade de anticorpos é gerada. As imunoglobulinas consistem em duas cadeias polipeptídicas pesadas e em duas leves (ver Figura 5-21). Cada cadeia tem duas regiões, uma região variável, com uma sequência que varia muito de uma imunoglobulina para outra, e uma região praticamente constante dentro de uma classe de imunoglobulinas. Há também duas famílias diferentes de cadeias leves, kappa e lambda, que diferem um pouco nas sequências de suas regiões constantes. Para os três tipos de cadeias polipeptídicas (cadeia pesada e cadeias leves kappa e lambda), a diversidade nas regiões variáveis é gerada por um mecanismo semelhante. Os genes para esses polipeptídeos são divididos em segmentos, e o genoma contém grupos com múltiplas versões de cada segmento. A união de uma versão de cada segmento de gene cria um gene completo.

A **Figura 25-42** retrata a organização do DNA que codifica as cadeias leves kappa da IgG humana e mostra como uma cadeia leve kappa madura é produzida. Em células indiferenciadas, a informação codificadora dessa cadeia polipeptídica é separada em três segmentos. O segmento V (variável) codifica os primeiros 95 resíduos de aminoácidos da região variável, o segmento J (ligação) codifica os 12 resíduos restantes da região variável e o segmento C codifica a região constante. O genoma contém ~ 300 segmentos V diferentes, 4 segmentos J diferentes e 1 segmento C.

À medida que uma célula-tronco na medula óssea se diferencia para formar um linfócito B maduro, um segmento V e um segmento J são reunidos por um sistema de recombinação especializado (Figura 25-42). Durante essa deleção programada do DNA, o DNA interveniente é descartado. Há cerca de $300 \times 4 = 1.200$ possíveis combinações V–J. O processo de recombinação não é tão preciso como a recombinação sítio-específica descrita anteriormente, de modo que variações adicionais ocorrem na sequência na junção V–J. Isso aumenta a variação total em cerca de pelo menos 2,5 vezes, de modo que as células podem gerar em torno de $2{,}5 \times 1.200 = 3.000$ combinações V–J diferentes. A junção final da combinação V–J à região C é realizada por uma reação de RNA-*splicing* após a transcrição, processo descrito no Capítulo 26.

O mecanismo de recombinação para junção dos segmentos V e J é ilustrado na **Figura 25-43**. Um pouco além de cada segmento V e imediatamente antes de cada segmento J se situam as sequências de sinalização de recombinação (RSS). Estas são ligadas por proteínas denominadas RAG1 e RAG2 (produtos do gene ativador de recombinação, *r*ecombination *a*ctivating *g*ene). As proteínas RAG catalisam a formação de uma quebra da fita dupla entre as sequências de sinalização e os segmentos V (ou J) a serem unidos. Os

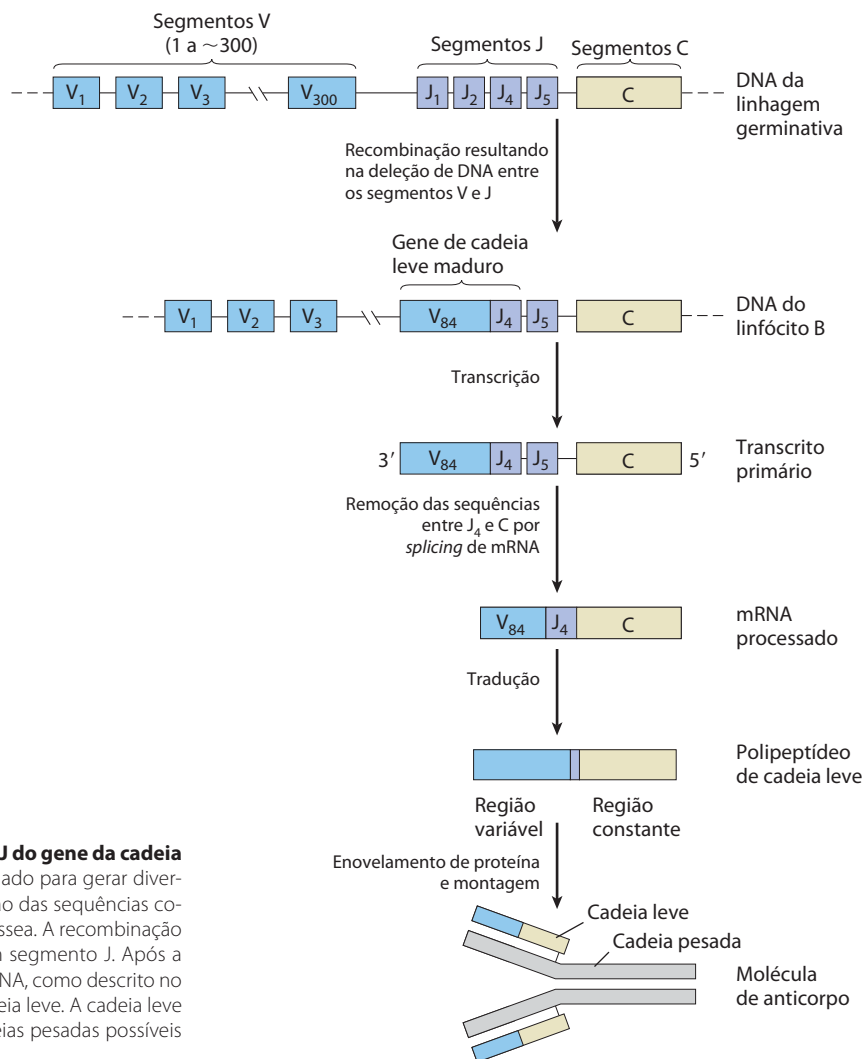



**FIGURA 25-42 Recombinação dos segmentos V e J do gene da cadeia leve kapa da IgG humana.** Este processo é desenhado para gerar diversidade de anticorpos. No topo é mostrada a disposição das sequências codificadoras de IgG em uma célula-tronco da medula óssea. A recombinação deleta o DNA entre um segmento V específico e um segmento J. Após a transcrição o transcrito é processado pelo *splicing* de RNA, como descrito no Capítulo 26; a tradução produz o polipeptídeo de cadeia leve. A cadeia leve pode se combinar com qualquer uma das 5.000 cadeias pesadas possíveis para produzir a molécula de anticorpo.

segmentos V e J são então reunidos com o auxílio de um segundo complexo de proteínas.

Os genes para as cadeias pesadas e as cadeias leves lambda se formam um processo semelhante. As cadeias pesadas possuem mais segmentos de genes que as cadeias leves, com mais de 5.000 combinações possíveis. Como qualquer cadeia pesada pode se combinar com qualquer cadeia leve para gerar uma imunoglobulina, cada ser humano tem, pelo menos, $3.000 \times 5.000 = 1{,}5 \times 10^7$ IgGs possíveis. Diversidade adicional é gerada por altas taxas de mutação (de mecanismo desconhecido) nas sequências V durante a diferenciação do linfócito B. Cada linfócito B maduro produz apenas um tipo de anticorpo, mas a gama de anticorpos produzidos pelos linfócitos B de um indivíduo é claramente enorme.

Terá o sistema imune evoluído em parte de transposons antigos? O mecanismo de geração de quebras de fita dupla por RAG1 e RAG2 de fato espelha várias etapas de reação na transposição (Figura 25-43). Além disso, o DNA excluído, com seu RSS terminal, tem uma estrutura de sequência encontrada na maioria dos transposons. Em testes em tubos de ensaio, RAG1 e RAG2 podem se associar a esse DNA excluído e inseri-lo, de modo semelhante a um transposon, em outras moléculas de DNA (provavelmente uma reação rara em linfócitos B). Embora não se saiba com certeza, as propriedades do sistema de rearranjo de genes de imunoglobulina sugere uma origem intrigante, na qual a distinção entre o hospedeiro e o parasita tornou-se turva pela evolução.

## RESUMO 25.3 Recombinação do DNA

- As sequências de DNA são rearranjadas em reações de recombinação, geralmente em processos fortemente coordenados com a replicação ou reparo do DNA.
- A recombinação genética homóloga pode acontecer entre duas moléculas de DNA quaisquer que partilhem uma sequência homóloga. Em bactérias, a recombinação funciona principalmente como um processo de reparo do DNA, centrado em reativar forquilhas de replicação paradas ou fechadas, ou no reparo geral de quebras da fita dupla. Em eucariontes, a recombinação é essencial para assegurar a segregação cromossômica precisa durante a primeira divisão celular meiótica. Ela também ajuda a criar a diversidade genética nos gametas resultantes.

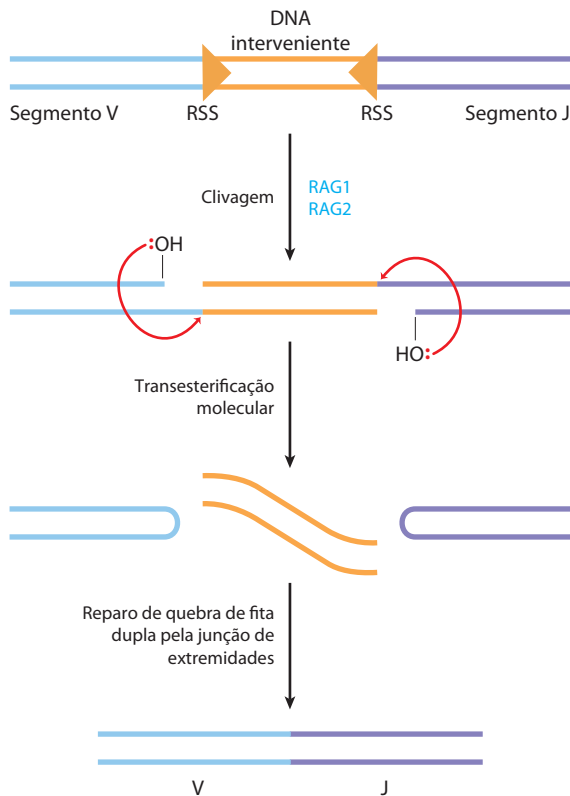



**FIGURA 25-43 Mecanismo de rearranjo do gene da imunoglobulina.** As proteínas RAG1 e RAG2 se ligam às sequências de sinalização de recombinação (RSS) e clivam uma fita de DNA entre os segmentos RSS e V (ou J) a serem ligados. A 3′-hidroxila liberada atua então como nucleófilo, atacando uma ligação fosfodiéster na outra fita para criar uma quebra de fita dupla. O grampo resultante se curva, os segmentos V e J são clivados e as extremidades são covalentemente ligadas por um complexo de proteínas especializadas para o reparo de ligação de extremidades de quebras de fita dupla. As etapas na geração da quebra de fita dupla catalisadas pelo RAG1 e RAG2 são quimicamente relacionadas a etapas nas reações de transposição.

- A recombinação sítio-específica ocorre apenas nas sequências-alvo específicas, e esse processo também pode envolver um intermediário de Holliday. As recombinases clivam o DNA em pontos específicos e ligam as fitas a novos parceiros. Esse tipo de recombinação é encontrado em praticamente todas as células, e suas muitas funções incluem a integração do DNA e a regulação da expressão gênica.
- Em praticamente todas as células, os transposons utilizam a recombinação para se mover dentro ou entre os cromossomos. Em vertebrados, uma reação de recombinação programada relacionada à transposição une segmentos de genes de imunoglobulinas para formar genes de imunoglobulinas durante a diferenciação do linfócito B.

## Termos-chave

*Termos em negrito são definidos no glossário.*

**molde** 1011
replicação semiconservativa 1011
**forquilha de replicação** 1012
**origem** 1012
fragmentos de Okazaki 1012
**fita líder** 1012
**fita retardada** 1013
**nucleases** 1013
**exonucleases** 1013
**endonucleases** 1013
DNA-polimerase I 1013
**iniciador (*primer*)** 1014
**terminal do iniciador** 1014
**processividade** 1014
**revisão** 1015
DNA-polimerase III 1016
**replissomo** 1017
**helicases** 1017
**topoisomerases** 1017
**primases** 1018
**DNA-ligases** 1018
elemento de desenrolamento do DNA (DUE) 1019
AAA+ ATPases 1019
**primossomo** 1021
**catenano** 1024
complexo pré-replicativo (pré-RC) 1025
licenciamento 1025
proteína de manutenção de minicromossomos (MCM) 1025
ORC (complexo de reconhecimento de origem) 1025
DNA-polimerase $\alpha$ 1026
DNA-polimerase $\delta$ 1026
DNA-polimerase $\varepsilon$ 1026
**mutação** 1027
reparo de excisão de base 1030
DNA-glicosilases 1030
sítio AP 1030
AP endonucleases 1031
DNA-fotoliases 1032
síntese de DNA translesão propensa a erro 1034
**resposta SOS** 1035
**recombinação genética homóloga** 1038
**recombinação sítio-específica** 1038
transposição de DNA 1038
**reparo do DNA recombinante** 1039
**migração do ramo** 1040
**intermediário de Holliday** 1040
**meiose 1041**
modelo de reparo da quebra da fita dupla 1046
**transposon** 1049
**transposição** 1049
**sequência de inserção** 1049
**cointegrado** 1049

## Leituras adicionais

### Geral

**Cox, M.M., Doudna, J.A., & O'Donnell, M.E.** (2012) *Molecular Biology: Principles and Practice*, W. H. Freeman and Company, New York, NY.
Uma excelente introdução à ciência e como ela é feita.

**Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A., & Ellenberger, T.** (2006) *DNA Repair and Mutagenesis*, 2nd edn, American Society for Microbiology, Washington, DC.
Exaustivo tratamento do metabolismo do DNA e um bom local para iniciar a exploração nesse campo.

### Replicação do DNA

**Bloom, L.B.** (2006) Dynamics of loading the *Escherichia coli* DNA polymerase processivity clamp. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 179–208.

**Heller, R.C. & Marians, K.J.** (2006) Replisome assembly and the direct restart of stalled replication forks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 932–943.
Mecanismos para o reinício das forquilhas de replicação antes do reparo do dano no DNA.

**Hübscher, U., Maga, G., & Spadari, S.** (2002) Eukaryotic DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 133–163.
Bom resumo das propriedades e funções de mais de uma dúzia de DNA-polimerases eucarióticas conhecidas.

**Indiani, C. & O'Donnell, M.** (2006) The replication clamp-loading machine at work in the three domains of life. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 751–761.

**Kaguni, J.** (2011) Replication initiation at the *Escherichia coli* chromosomal origin. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 606–613.

**Kool, E.T.** (2002) Active site tightness and substrate fit in DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 191–219.
Excelente resumo da base molecular da fidelidade de replicação por uma DNA-polimerase – geometria dos pares de bases bem como das ligações de hidrogênio.

**Kunkel, T.A. & Burgers, P.M.** (2008) Dividing the workload at a eukaryotic replication fork. *Trends Cell Biol.* **18**, 521–527.

**Masai, H., Matsumoto, S., You, Z.Y., Yoshizawa-Sugata, N., & Oda, M.** (2010) Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 89–130.

**O'Donnell, M.** (2006) Replisome architecture and dynamics in *Escherichia coli. J. Biol. Chem.* **281**, 10,653–10,656.
Excelente resumo do que acontece em uma forquilha de replicação.

**Stillman, B.** (2005) Origin recognition and the chromosome cycle. *FEBS Lett.* **579**, 877–884.
Bom resumo da iniciação da replicação do DNA eucariótico.

### Reparo de DNA

**Erzberger, J.P. & Berger, J.M.** (2006) Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35**, 93–114.

**Lynch, M.** (2010) Evolution of the mutation rate. *Trends Genet.* **26**, 345–352. **Kunkel, T.A. & Erie, D.A.** (2005) DNA mismatch repair. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 681–710.

**Kunkel, T.A. & Erie, D.A.** (2005) DNA mismatch repair. *Annu. Rev. Biochem*. 74, 681–710.

**Schlacher, K. & Goodman, M.J.** (2007) Lessons from 50 years of SOS DNAdamage-induced mutagenesis *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **8**, 587–594.

**Sutton, M.D., Smith, B.T., Godoy, V.G., & Walker, G.C.** (2000) The SOS response: recent insights into umuDC-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance. *Annu. Rev. Genet.* **34**, 479–497.

**Wilson, D.M. III & Bohr, V.A.** (2007) The mechanics of base excision repair, and its relation to aging and disease. *DNA Repair* **6**, 544–559.

### Recombinação do DNA

**Cox, M.M.** (2001) Historical overview: searching for replication help in all of the rec places. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8173–8180.
Revisão de como ficou demonstrado que a recombinação é um processo de reparo da forquilha de replicação.

**Cox, M.M.** (2007) Regulation of bacterial RecA protein function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **42**, 41–63.

**Grindley, N.D.F., Whiteson, K.L., & Rice, P.A.** (2006) Mechanisms of sitespecific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 567–605.

**Haniford, D.B.** (2006) Transpososome dynamics and regulation in Tn10 transposition. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. **41**, 407–424.
Visão detalhada de um transposon bacteriano bem estudado.

**Heyer, W.-D., Ehmsen, K.T., & Liu, J.** (2010) Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet*. **44**, 113–139.

**Levin, H.L. & Moran, J.V.** (2011) Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 615–627.

**Lusetti, S.L. & Cox, M.M.** (2002) The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 71–100.

**Mimitou, E. P. & Symington, L.S.** (2009) Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 264–272.

**Montano, S.P. & Rice, P.A.** (2011) Moving DNA around: DNA transposition and retroviral integration. *Curr. Opin. Struct. Biol*. **21**, 370–378.

**San Filippo, J., Sung, P., & Klein, H.** (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 229–257.

**Singleton, M.R., Dillingham, M.S., Gaudier, M., Kowalczykowski, S.C., & Wigley, D.B.** (2004) Crystal structure of RecBCD enzyme reveals a machine for processing DNA breaks. *Nature* **432**, 187–193.

## Problemas

**1. Conclusões a partir do experimento de Meselson-Stahl.** O experimento de Meselson-Stahl (ver Figura 25-2) provou que o DNA sofre replicação semiconservativa em *E. coli.* No modelo "dispersivo" da replicação do DNA, as fitas parentais de DNA são clivadas em partes de tamanhos aleatórios, sendo então ligadas a peças do DNA recém-replicado para formar fitas duplex filhas. Explique como os resultados do experimento de Meselson e Stahl descartaram esse modelo.

**2. Análise de isótopos pesados na replicação do DNA.** Uma cultura de *E. coli* crescendo em um meio contendo $^{15}NH_4Cl$ é trocada para um meio contendo $^{14}NH_4Cl$ por três gerações (aumento de oito vezes na população). Qual é a razão molar entre o DNA híbrido ($^{15}N$–$^{14}N$) e o DNA leve ($^{14}N$–$^{14}N$) nesse ponto?

**3. Replicação do cromossomo de *E. coli*.** O cromossomo de *E. coli* contém 4.639.221 pb.

(a) Como as muitas voltas da dupla-hélice devem ser desenroladas durante a replicação do cromossomo de *E. coli*?

(b) A partir dos dados deste capítulo, quanto tempo levaria para replicar o cromossomo de *E. coli* a 37°C se duas forquilhas de replicação prosseguissem a partir da origem? Assuma que a replicação ocorre a uma taxa de 1.000 pb/s. Sob algumas condições, as células de *E.coli* podem se dividir a cada 20 min. Como isso seria possível?

(c) Na replicação do cromossomo de *E. coli,* cerca de quantos fragmentos de Okazaki poderiam ser formados? Que fatores garantem que os numerosos fragmentos de Okazaki são reunidos na ordem correta no novo DNA?

**4. Composição de bases dos DNAs feitos a partir de moldes de fitas simples.** Preveja a composição de bases do DNA total sintetizado por DNA-polimerase nos moldes fornecidos por uma mistura equimolar de duas fitas complementares do DNA do bacteriófago $\phi$X174 (molécula de DNA circular). A composição de bases de uma fita é A, 24,7%; G, 24,1%; C, 18,5%; e T, 32,7%. Que pressuposto é necessário para responder esse problema?

**5. Replicação do DNA.** Kornberg e colaboradores incubaram extratos solúveis de *E. coli* com uma mistura de dATP, dTTP, dGTP e dCTP, todos marcados com $^{32}P$ no grupo fosfato $\alpha$. Após um período de tempo, a mistura da incubação foi tratada com ácido tricloroacético, que precipita o DNA, mas não os precursores de nucleotídeos. O precipitado foi recolhido e o grau de incorporação dos precursores no DNA foi determinado a partir da quantidade de radioatividade presente no precipitado.

(a) Se qualquer um dos quatro precursores de nucleotídeos fosse omitido da mistura de incubação, a radioatividade poderia ser encontrada no precipitado? Explique.

(b) Poderia o $^{32}$P ser incorporado no DNA se apenas o dTTP fosse marcado? Explique.

(c) A radioatividade poderia ser encontrada no precipitado se $^{32}$P marcasse o fosfato $\beta$ ou o $\gamma$ em vez do fosfato $\alpha$ dos desoxirribonucleotídeos? Explique.

**6. A química da replicação do DNA.** Todas as DNA-polimerases sintetizam fitas novas de DNA na direção 5′→3′. Em alguns aspectos, a replicação das fitas antiparalelas de DNA duplo poderia seria mais simples se houvesse também um segundo tipo de polimerase, um que sintetizasse o DNA na direção 3′→5′. Os dois tipos de polimerases poderiam, em princípio, coordenar a síntese do DNA sem os mecanismos complicados necessários para a replicação da fita retardada. Entretanto, não foi descoberta tal enzima de síntese na direção 3′→5′. Sugira dois mecanismos possíveis para a síntese do DNA na direção 3′→5′. O pirofosfato deveria ser um produto de ambas as reações propostas. Um ou ambos os mecanismos podem ser apoiados em uma célula? Sim ou não? Por quê? (Dica: sugira a utilização de precursores do DNA ausentes nas células existentes).

**7. Atividades das DNA-polimerases.** Você está caracterizando uma nova DNA-polimerase. Quando a enzima é incubada com DNA marcado com [$^{32}$P] e sem dNTPs, você pode observar a liberação de [$^{32}$P]dNMP. Essa liberação é impedida pela adição de dNTPs não marcados. Explique as reações que provavelmente mais contribuem para essas observações. O que você esperaria observar se você adicionasse pirofosfato em vez de dNTPs?

**8. Fitas líder e retardada.** Prepare uma tabela que liste os nomes e compare as funções dos precursores, enzimas e outras proteínas necessárias para construir a fita líder *versus* a fita retardada durante a replicação do DNA em *E. coli*.

**9. Função da DNA-ligase.** Alguns mutantes de *E. coli* contêm DNA-ligase defeituosa. Quando esses mutantes são expostos à timina marcada com $^{3}$H e o DNA produzido é sedimentado em um gradiente de densidade de sacarose alcalina, duas bandas radioativas aparecem. Uma corresponde à fração de alto peso molecular, a outra à fração de baixo peso molecular. Explique.

**10. Fidelidade da replicação do DNA.** Que fatores promovem a fidelidade da replicação durante a síntese da fita líder do DNA? Você esperaria que a fita retardada fosse feita com a mesma fidelidade? Explique suas respostas.

**11. Importância das DNA-topoisomerases na replicação do DNA.** O DNA desenrolando, como ocorre na replicação, afeta a densidade super-helicoidal do DNA. Na ausência de topoisomerases, o DNA se tornaria superenrolado à frente da forquilha de replicação, do mesmo modo que atrás dela está o DNA desenrolado. Uma forquilha de replicação bacteriana irá parar quando a densidade super-helicoidal ($\sigma$) do DNA à frente da forquilha atinge +0,14 (ver Capítulo 24).

A replicação bidirecional se inicia na origem de um plasmídeo de 6.000 pb, *in vitro*, na ausência de topoisomerases. O plasmídeo inicialmente tem um $\sigma$ de –0,06. Quantos pares de bases serão desenrolados e replicados por cada forquilha de replicação antes que a forquilha pare? Assuma que ambas as forquilhas viajam na mesma velocidade e que cada uma inclui todos os componentes necessários para o alongamento, exceto a topoisomerase.

**12. O teste de Ames.** Em um meio nutriente sem histidina, uma fina camada de ágar contendo ~$10^9$ células de *Salmonella typhimurium* auxotrofas para histidina (células mutantes que requerem histidina para sobreviver) produz ~13 colônias em um período de dois dias de incubação a 37°C (ver Figura 25-20). Como essas colônias surgem na ausência de histidina? O experimento é repetido na presença de 0,4 $\mu$g de 2-aminoantraceno. O número de colônias produzidas em dois dias excede 10.000. O que isso indica a respeito do 2-aminoantraceno? O que você pode prever a respeito de sua carcinogenicidade?

**13. Mecanismos de reparo do DNA.** As células de vertebrados e de vegetais frequentemente metilam a citosina no DNA para formar 5-metilcitosina (ver Figura 8-5a). Nessas mesmas células, um sistema de reparo especializado reconhece malpareamentos G–T e os repara para pares de bases G≡C. Como esse sistema de reparo pode ser vantajoso para a célula? (Explique em termos da presença de 5-metilcitosina no DNA.)

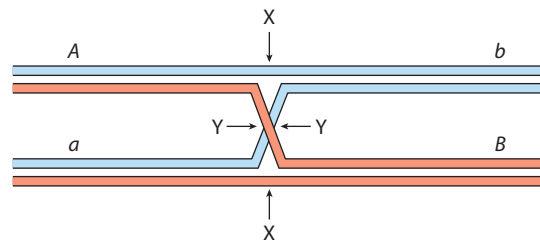
**14. Reparo do DNA em pessoas com xeroderma pigmentoso.** A condição conhecida como xeroderma pigmentoso (XP) surge a partir de mutações em, pelo menos, sete genes humanos diferentes (ver Quadro 25-1). As deficiências são, geralmente, em genes que codificam enzimas envolvidas em alguma parte da via de reparo de excisão de nucleotídeos em humanos. Os vários tipos de XP são denominados de A até G (XPA, XPB, etc.), com algumas poucas variantes adicionais conhecidas sob a denominação de XP-V.

Culturas de fibroblastos de indivíduos saudáveis e de pacientes com XPG são irradiadas com luz ultravioleta. O DNA é isolado e desnaturado, e as fitas simples de DNA assim obtidas são caracterizadas por ultracentrifugação analítica.

(a) Amostras de fibroblastos normais mostram uma redução significativa no peso molecular médio das fitas simples de DNA após a irradiação, mas as amostras de fibroblastos XPG não mostram tal redução. Como isso pode ocorrer?

(b) Se você considerar que o sistema de reparo de excisão de nucleotídeos está operante nos fibroblastos, qual etapa poderá estar defeituosa nas células de pacientes com XPG? Explique.

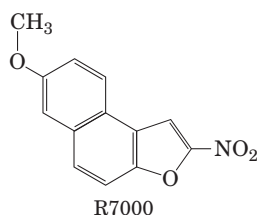
**15. Intermediários de Holliday.** Como a formação de intermediários de Holliday na recombinação genética homóloga difere de sua formação na recombinação sítio-específica?

**16. Clivagem dos intermediários de Holliday.** Um intermediário de Holliday é formado entre dois cromossomos homólogos, em um ponto entre os genes *A* e *B*, como mostrado a seguir. Os cromossomos têm alelos diferentes dos dois genes (*A* e *a*, *B* e *b*). Onde os intermediários de Holliday poderiam ser clivados (pontos X e/ou Y) para gerar um cromossomo que poderia transportar (a) um genótipo *Ab* ou (b) um genótipo *ab*?

**17. Uma conexão entre replicação e recombinação sítio-específica.** A maioria das linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* tem múltiplas cópias do plasmídeo circular 2$\mu$ (assim denominado em razão do seu contorno de cerca de 2 $\mu$m), o qual tem aproximadamente 6.300 pb de DNA. Para a sua replicação, o plasmídeo utiliza o sistema de replicação do hospedeiro, sob o mesmo controle estrito usado para os cromossomos celulares do hospedeiro, replicando apenas uma vez a cada ciclo celular. A replicação do plasmídeo é

bidirecional, com ambas as forquilhas de replicação iniciando em uma única origem bem definida. Entretanto, um ciclo de replicação do plasmídeo 2$\mu$ pode resultar em mais de duas cópias do plasmídeo, permitindo a amplificação do seu número de cópias (número de cópias de plasmídeos por célula) sempre que a segregação do plasmídeo durante a divisão celular deixa uma célula-filha com menos plasmídeos do que o complemento normal de cópias do mesmo. A amplificação precisa de um sistema de recombinação sítio-específico codificado pelo plasmídeo, o qual serve para inverter uma parte do plasmídeo em relação à outra. Explique como um evento de inversão sítio-específica pode resultar na amplificação do número de cópias do plasmídeo. (Dica: considere a situação quando as forquilhas de replicação duplicaram um sítio de recombinação, mas não o outro.)

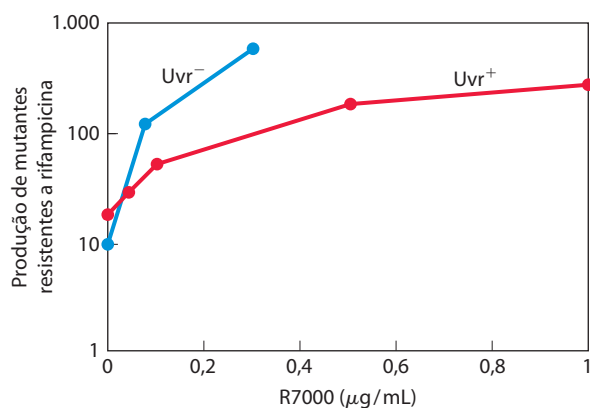
## Problema de análise de dados

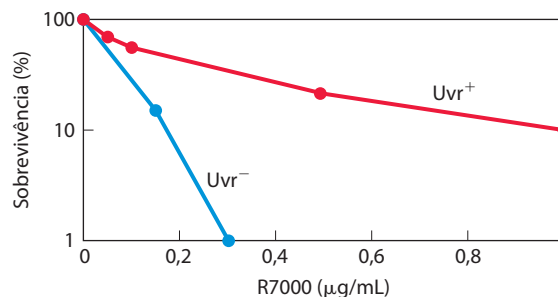
**18. Mutagênese em *Escherichia coli.*** Muitos compostos mutagênicos atuam por meio da alquilação de bases no DNA. O agente alquilante R7000 (7-metóxi-2-nitronafto[2,1-*b*]furano) é um agente mutagênico extremamente potente.

$CH_3$ O $NO_2$ O

R7000

*In vivo*, o R7000 é ativado pela enzima nitrorredutase, e essa forma mais reativa se liga covalentemente ao DNA – principalmente, mas não exclusivamente, a pares de bases G≡C.

Em um estudo de 1996, Quillardet, Touati e Hofnung investigaram os mecanismos pelos quais o R7000 causa mutações em *E. coli.* Eles compararam a atividade genotóxica do R7000 em duas linhagens de *E. coli*: o tipo selvagem (Uvr$^+$) e os mutantes sem atividade *uvrA* (Uvr$^-$; ver Tabela 25-6). Eles primeiramente mediram as taxas de mutagênese. A rifampicina é um inibidor da RNA-polimerase (ver Capítulo 26). Na sua presença, as células não crescem, a não ser que ocorram algumas mutações no gene que codifica a RNA-polimerase. O aparecimento de colônias resistentes à rifampicina fornece, assim, uma medida útil das taxas de mutagênese.

Os efeitos de concentrações diferentes de R7000 foram determinados, com os resultados mostrados no gráfico a seguir.

(a) Por que alguns mutantes são produzidos mesmo quando não há R7000 presente?

Quillardet e colaboradores também mediram a taxa de sobrevivência de bactérias tratadas com diferentes concentrações de R7000 obtendo os resultados a seguir.

(b) Explique como o tratamento com R7000 é letal para as células.

(c) Explique as diferenças nas curvas de mutagênese e nas curvas de sobrevivência para os dois tipos de bactérias, Uvr$^+$ e Uvr$^-$, como mostrado nos gráficos.

Os pesquisadores então mediram a quantidade de R7000 covalentemente ligada ao DNA em *E. coli* Uvr$^+$ e Uvr$^-$. Eles incubaram as bactérias com [$^3$H]R7000 por 10 ou 70 minutos, extraíram o DNA e mediram seu conteúdo de $^3$H em contagens por minuto (cpm) por $\mu$g de DNA.

| Tempo (minutos) | $^3$H no DNA (cpm/$\mu$g) Uvr$^+$ | Uvr$^-$ |
|---|---|---|
| 10 | 76 | 159 |
| 70 | 69 | 228 |

(d) Explique por que a quantidade de $^3$H diminui com o tempo na linhagem Uvr$^+$ e aumenta com o tempo na linhagem Uvr$^-$.

Quillardet e colaboradores então examinaram as mudanças nas sequências de DNA específicas causadas pelo R7000 nas bactérias Uvr$^+$ e Uvr$^-$. Para tanto, eles utilizaram seis linhagens diferentes de *E. coli*, cada uma com uma mutação pontual diferente no gene *lacZ*, o qual codifica a $\beta$ galactosidase (essa enzima catalisa a mesma reação que a lactase; ver Figura 14–11). As células com qualquer uma dessas mutações têm uma $\beta$ galactosidade não funcional e são incapazes de metabolizar a lactose (i.e., um fenótipo Lac$^-$). Cada tipo de mutação pontual precisou de uma mutação reversa específica para restaurar a função do gene *lacZ* e o fenótipo Lac$^+$. Cultivando células em um meio de cultura contendo lactose como única fonte de carbono, foi possível selecionar aquelas com mutação reversa, ou seja, células Lac$^+$. Pela contagem do número de células Lac$^+$ após a mutagênese de uma determinada linhagem, os pesquisadores puderam medir as frequências de cada tipo de mutação.

Primeiro, eles observaram o espectro de mutações nas células Uvr$^-$ . A tabela a seguir mostra os resultados para as seis linhagens, CC101 a CC106 (com a mutação pontual necessária para produzir células Lac$^+$ indicada entre parênteses).

| R7000 ($\mu$g/mL) | Número de células Lac$^+$ (média ± D.P.) CC101 (A═T para C≡G) | CC102 (G≡C para A═T) | CC103 (G≡C para C≡G) | CC104 (G≡C para T═A) | CC105 (A═T para T═A) | CC106 (A═T para G≡C) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 6 ± 3 | 11 ± 9 | 2 ± 1 | 5 ± 3 | 2 ± 1 | 1 ± 1 |
| 0,075 | 24 ± 19 | 34 ± 3 | 8 ± 4 | 82 ± 23 | 40 ± 14 | 4 ± 2 |
| 0,15 | 24 ± 4 | 26 ± 2 | 9 ± 5 | 180 ± 71 | 130 ± 50 | 3 ± 2 |

(e) Que tipos de mutações mostram aumentos significativos acima da taxa basal de mutação em função do tratamento com R7000? Dê uma explicação plausível para o fato de algumas apresentarem frequência maior do que outras.

(f) Todas as mutações que você listou em (e) poderiam ser explicadas como resultado de uma ligação covalente do R7000 a um par de bases G≡C? Explique seu raciocínio.

(g) A Figura 25-27b mostra como a metilação de resíduos de guanina pode resultar em uma mutação de G≡C para A═T. Utilizando uma via semelhante, mostre como um aduto G–R7000 pode resultar nas mutações do tipo G≡C para A═T ou T═A mostrado acima. Que bases pareiam com o aduto G–R7000?

Os resultados para a bactéria Uvr$^+$ são mostrados na tabela a seguir:

| | Número de células Lac$^+$ (média ± D.P.) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| R7000 ($\mu$g/mL) | CC101 (A═T para C≡G) | CC102 (G≡C para A═T) | CC103 (G≡C para C≡G) | CC104 (G≡C para T═A) | CC105 (A═T para T═A) | CC106 (A═T para G≡C) |
| 0 | 2 ± 2 | 10 ± 9 | 3 ± 3 | 4 ± 2 | 6 ± 1 | 0,5 ± 1 |
| 1 | 7 ± 6 | 21 ± 9 | 8 ± 3 | 23 ± 15 | 13 ± 1 | 1 ± 1 |
| 5 | 4 ± 3 | 15 ± 7 | 22 ± 2 | 68 ± 25 | 67 ± 14 | 1 ± 1 |

(h) Esses resultados mostram que todos os tipos de mutações são reparados com igual fidelidade? Dê uma explicação plausível para a sua resposta.

## Referências

**Quillardet, P., Touati, E., & Hofnung, M.** (1996) Influence of the *uvr* dependent nucleotide excision repair on DNA adducts formation and mutagenic spectrum of a potent genotoxic agent: 7-methoxy-2-nitronaphtho[2,1-*b*]furan (R7000). *Mutat. Res.* **358**, 113–122.

# 26

# Metabolismo de RNA



A expressão da informação em um gene geralmente envolve a produção de uma molécula de RNA transcrita a partir de um molde de DNA. À primeira vista, fitas de RNA e DNA podem ser muito semelhantes, diferindo apenas pelo fato do RNA ter um grupo hidroxila na posição 2′ da aldopentose e uracila em vez de timina. No entanto, ao contrário do DNA, a maioria dos RNA desempenha suas funções como fitas simples, que se dobram sobre si mesmas e têm o potencial para uma diversidade estrutural muito maior do que o DNA (Capítulo 8). O RNA é, portanto, adequado para uma variedade de funções celulares.

O RNA é a única macromolécula conhecida que tem um papel tanto no armazenamento da informação quanto na catálise, o que levou a muita especulação a respeito do seu possível papel como intermediário químico no desenvolvimento da vida neste planeta. A descoberta de RNAs catalisadores, ou ribozimas, alterou a própria definição de uma enzima, estendendo-a além do domínio das proteínas.

As proteínas, no entanto, permanecem essenciais para o RNA e suas funções. Na célula moderna, todos os ácidos nucleicos, incluindo os RNAs, são complexados com proteínas. Alguns desses complexos são bastante elaborados, e o RNA pode assumir tanto papéis estruturais quanto catalíticos no interior de máquinas bioquímicas complicadas.

Todas as moléculas de RNA, exceto os genomas de RNA de certos vírus, são derivadas de informação permanentemente armazenada no DNA. Durante a **transcrição**, um sistema de enzimas converte a informação genética de um segmento de fita dupla de DNA em um filamento de RNA com uma sequência de bases complementar a uma das fitas de DNA. Três tipos principais de RNA são produzidos. Os **RNAs mensageiros** (**mRNA**) codificam a sequência de aminoácidos de um ou mais polipeptídeos especificados por um gene ou conjunto de genes. Os **RNAs transportadores** (**tRNA**) leem a informação codificada no mRNA e transferem o aminoácido adequado para uma cadeia polipeptídica em crescimento durante a síntese de proteínas. Os **RNAs ribossomais** (**rRNA**) são constituintes dos ribossomos, as máquinas celulares intrincadas que sintetizam proteínas. Muitos RNAs adicionais especializados têm funções regulatórias ou catalíticas ou são precursores das três classes principais de RNA. Esses RNAs de função especial não são mais considerados como espécies secundárias no catálogo de RNAs celulares. Nos vertebrados, os RNAs que não se encaixam em uma das categorias clássicas (mRNA, tRNA, rRNA) parecem exceder enormemente aqueles que o fazem.

Durante a replicação, o cromossomo inteiro é em geral copiado, mas a transcrição é mais seletiva. Apenas genes ou grupos de genes particulares são transcritos a qualquer momento, e algumas porções do genoma de DNA nunca são transcritas. A célula restringe a expressão da informação genética à formação dos produtos gênicos necessários em qualquer momento particular. Sequências regulatórias específicas marcam o início e o final dos segmentos de DNA a serem transcritos e designam qual fita no duplex de DNA será usada como molde. O próprio transcrito pode interagir com outras moléculas de RNA como parte do programa regulatório geral. A regulação da transcrição é descrita em detalhe no Capítulo 28.

A soma de todas as moléculas de RNA produzidas em uma célula sob um determinado conjunto de condições é chamado de **transcriptoma** celular. Dada a fração relativamente pequena do genoma humano destinada a genes codificadores de proteínas, seria esperado que apenas uma pequena parte do genoma humano fosse transcrita. Não é o caso. A moderna análise de microarranjo dos padrões de transcrição revelou que a maior parte do genoma de humanos e de outros mamíferos é transcrita em RNA. Os produtos não são predominantemente mRNA, tRNA ou rRNA, mas sim RNAs de função especial, dos quais uma série está sendo descoberta. Muitos deles parecem estar envolvidos na regulação da expressão gênica; entretanto, o ritmo rápido de descoberta nos forçou a reconhecer que não se sabe o quê muitos desses RNAs fazem.

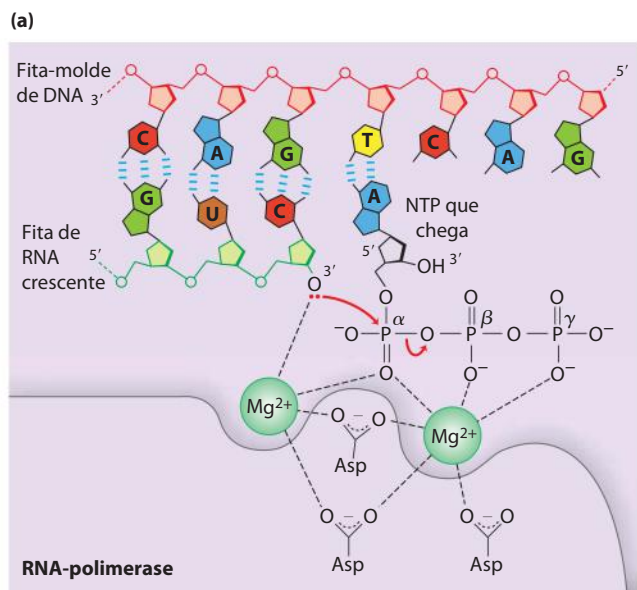
Nesse capítulo, examina-se a síntese de RNA a partir de um molde de DNA e o processamento pós-síntese e reposição de moléculas de RNA. Ao fazê-lo, são abordadas muitas das funções especializadas do RNA, incluindo funções ca-

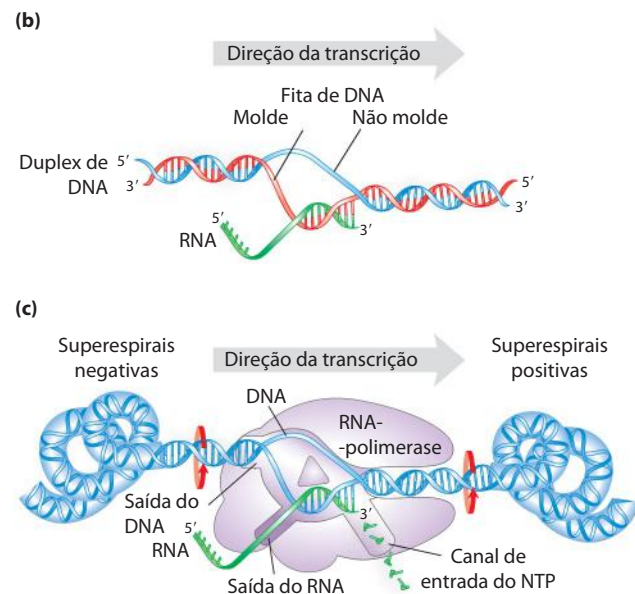
talisadoras. De maneira interessante, os substratos para as enzimas de RNA são frequentemente outras moléculas de RNA. Também descrevem-se sistemas em que o RNA é o molde e o DNA o produto, em vez do contrário. Portanto, as vias de informação são um círculo completo e revelam que a síntese de ácidos nucleicos dependente de molde apresenta regras padrão, independente da natureza do molde ou produto (RNA ou DNA). Esse exame da interconversão biológica de DNA e RNA como transportadores de informação leva a uma discussão a respeito da origem evolutiva da informação biológica.

## 26.1 Síntese de RNA dependente de DNA

A discussão da síntese de RNA começa com uma comparação entre a transcrição e a replicação do DNA (Capítulo 25). A transcrição se parece com a replicação no seu mecanismo químico fundamental, na sua polaridade (direção da síntese) e no seu uso de um molde. E, como a replicação, a transcrição tem fases de iniciação, alongamento e terminação – embora na literatura sobre transcrição, a iniciação é adicionalmente dividida em fases discretas de ligação de DNA e iniciação da síntese de RNA. A transcrição difere da replicação porque ela não requer um iniciador e, geralmente, envolve apenas segmentos limitados de uma molécula de DNA. Além disso, no interior dos segmentos transcritos, apenas uma fita de DNA serve de molde para uma molécula de RNA em particular.

### O RNA é sintetizado pelas RNA-polimerases

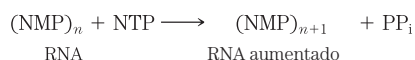
A descoberta da DNA-polimerase e sua dependência de um molde de DNA estimulou uma busca por uma enzima que sintetize RNA complementar a um filamento de DNA. Em 1960, quatro grupos de pesquisa detectaram independentemente uma enzima em extratos celulares que podia formar um polímero de RNA a partir de ribonucleosídeos 5′-trifosfatos. Trabalhos posteriores em RNA-polimerase purificada de *Escherichia coli* ajudaram a definir as propriedades fundamentais da transcrição (**Figura 26-1**). A **RNA-polimerase dependente de DNA** precisa, além de um molde DNA, de todos os quatro ribonucleosídeos 5′-trifosfatos (ATP, GTP, UTP e CTP) como precursores das unidades de nucleotídeos de RNA, bem como de $Mg^{2+}$. A proteína também liga um $Zn^{2+}$. A química e o mecanismo de síntese de RNA se assemelham fortemente àqueles usados pelas DNA-polimerases (ver Figura 25-5a). A RNA-polimerase alonga uma fita de RNA ao adicionar unidades de ribonucleotídeos à extremidade hidroxila 3′, construindo

**MECANISMO – FIGURA 26-1 Transcrição pela RNA-polimerase em *E. coli*.** Para a síntese de uma fita de RNA complementar a uma das duas fitas de DNA em uma dupla-hélice, o DNA é transitoriamente desenrolado. **(a)** Mecanismo catalítico da síntese de RNA pela RNA-polimerase. Observe que este é essencialmente o mesmo mecanismo usado pelas DNA-polimerases (ver Figura 25-5a). A reação envolve dois íons $Mg^{2+}$, coordenados para os grupos fosfato dos nucleosídeos trifosfatos (NTP) que chegam e para três resíduos Asp, que são altamente conservados nas RNA-polimerases de todas as espécies. Um íon $Mg^{2+}$ facilita o ataque pelo grupo hidroxila 3′ no fosfato $\alpha$ do NTP; o outro íon $Mg^{2+}$ facilita o deslocamento do pirofosfato e ambos íons metálicos estabilizam o estado de transição pentacovalente.

**(b)** Cerca de 17 pb de DNA são desenrolados a cada momento. A RNA-polimerase e a bolha de transcrição se movem da esquerda para a direita ao longo do DNA, como mostrado, facilitando a síntese de RNA. O DNA é desenrolado à frente e enrolado novamente anteriormente à medida que o RNA é transcrito. À medida que o DNA é enrolado novamente, o híbrido RNA-DNA é deslocado e a fita de RNA é expulsa.

**(c)** O movimento de uma RNA-polimerase ao longo do DNA tende a criar superespirais positivas (DNA superespiralizado) à frente da bolha de transcrição e superespirais negativas (DNA superdesespiralizado) antes dela. A RNA-polimerase está em contato estreito com o DNA à frente da bolha de transcrição, bem como com as fitas separadas de DNA e RNA no interior e imediatamente antes da bolha. Um canal nas proteínas canaliza novos NTP para o sítio ativo da polimerase. O *footprint* da polimerase envolve cerca de 35 pb de DNA durante o alongamento.

| | | |
|---|---|---|
| (5′) | C G C T A T A G C G T T T (3′) | Fita de DNA não molde (codificadora) |
| (3′) | G C G A T A T C G C A A A (5′) | Fita de DNA molde |
| (5′) | C G C U A U A G C G U U U (3′) | Transcrito de RNA |

**FIGURA 26-2 Fitas de DNA molde e não molde (codificadora).** As duas fitam complementares de DNA são definidas por sua função na transcrição. O transcrito de RNA é sintetizado na fita molde e é idêntico em sequência (com U no lugar de T) à fita não molde, ou fita codificadora.

o RNA na direção 5′→3′. O grupo hidroxila 3′ atua como nucleófilo, atacando o $\alpha$ fosfato do ribonucleosídeo trifosfato que chega (Figura 26-1a) e liberando o pirofosfato. A reação total é

$$\underset{\text{RNA}}{(\text{NMP})_n} + \text{NTP} \longrightarrow \underset{\text{RNA aumentado}}{(\text{NMP})_{n+1}} + \text{PP}_i$$

A RNA-polimerase precisa de DNA para sua atividade e é mais ativa quando ligada a um DNA de fita dupla. Como observado anteriormente, apenas uma das duas fitas serve de molde. A fita de DNA molde é copiada na direção 3′→5′ (antiparalela à nova fita de RNA), exatamente como na replicação do DNA. Cada nucleotídeo no RNA recentemente formado é selecionado pelas interações de pareamento de bases de Watson-Crick: resíduos U são inseridos no RNA para parear com resíduos A no molde de DNA, resíduos G são inseridos para parear com resíduos C, e assim por diante. A geometria dos pares de bases (ver Figura 25-6) também pode desempenhar um papel na seleção de bases.

Ao contrário da DNA-polimerase, a RNA-polimerase não precisa de um iniciador para a síntese. A iniciação ocorre quando a RNA-polimerase se liga a sequências de DNA específicas chamadas de promotores (descritas a seguir). O grupo 5′-trifosfato do primeiro resíduo em uma molécula de RNA nascente (recentemente formada) não é clivado para liberar $PP_i$, mas em vez disso permanece intacto ao longo de todo o processo de transcrição. Durante a fase de alongamento da transcrição, as bases da extremidade crescente da nova fita de RNA pareiam temporariamente com o molde de DNA para formar um pequeno RNA-DNA híbrido de dupla-hélice, estimado em 8 pb de comprimento (Figura 26-1b). O RNA nesse duplex híbrido "descasca" logo após a sua formação e o duplex de DNA volta a se formar.

A fim de permitir que a RNA-polimerase sintetize uma fita de RNA complementar a uma das fitas de DNA, o duplex de DNA deve se desenrolar em um pequeno trecho, formando uma "bolha" de transcrição. Durante a transcrição, a RNA-polimerase da *E. coli* geralmente mantém 17 pb desenrolados. Os híbridos de RNA-DNA de 8 pb ocorrem nessa região desenrolada. O alongamento de um transcrito pela RNA-polimerase da *E. coli* continua a uma taxa de 50 a 90 nucleotídeos/s. Como o DNA é uma hélice, o movimento de uma bolha de transcrição precisa de uma considerável rotação da fita das moléculas de ácido nucleico. A rotação da fita de DNA é restrita na maioria dos DNAs por proteínas que se ligam ao DNA e outras barreiras estruturais. Como resultado, uma RNA-polimerase em movimento gera ondas de superespirais positivas para a frente da bolha de transcrição e superespirais negativas para trás (Figura 26-1c). Isso foi observado tanto *in vitro* quanto *in vivo* (em bactérias). Na célula, os problemas topológicos causados pela transcrição são aliviados pela ação das topoisomerases (Capítulo 24).

**CONVENÇÃO-CHAVE:** As duas fitas de DNA complementar têm papéis diferentes na transcrição. A fita que serve como um molde para a síntese de RNA é chamada de **fita-molde**. A fita de DNA complementar ao molde, a **fita não molde**, ou **fita codificadora**, é idêntica na sequência de bases ao RNA transcrito a partir do gene, com o U no RNA no lugar do T no DNA (**Figura 26-2**). A fita codificadora de um gene em particular pode estar situada em qualquer das fitas de um determinado cromossomo (como mostrado em **Figura 26-3** para um vírus). Por convenção, as sequências regulatórias que controlam a transcrição (descritas posteriormente neste capítulo) são designadas pelas sequências na fita codificadora. ■

A RNA-polimerase dependente de DNA da *E. coli* é uma enzima complexa, grande, com cinco subunidades centrais

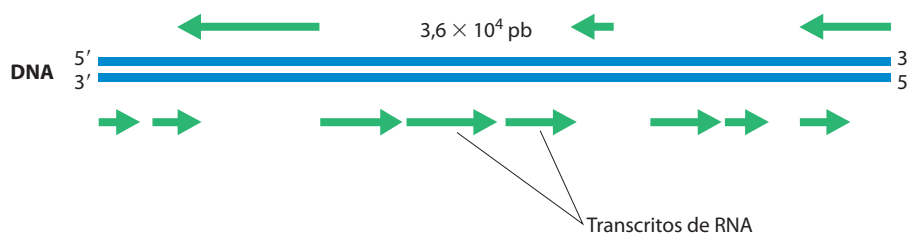



**FIGURA 26-3 Organização da informação codificadora no genoma do adenovírus.** A informação genética do genoma do adenovírus (exemplo convenientemente simples) é codificada por uma molécula de DNA de fita dupla de 36.000 pb, cujas duas fitas codificam proteínas. A informação para a maioria das proteínas é codificada pela (i.e., idêntica a) fita de cima – por convenção a fita orientada de 5′ para 3′ da esquerda para a direita. A fita de baixo atua como molde para esses transcritos. Entretanto, algumas poucas proteínas são codificadas pela fita de baixo, transcrita na direção oposta (e usa a fita de cima como molde). A síntese de mRNA em adenovírus é atualmente muito mais complexa do que mostrado aqui. Muitos dos mRNA obtidos usando a fita superior como molde são sintetizados inicialmente como um transcrito único longo (25.000 nucleotídeos), então extensamente processado para produzir os mRNA separados. O adenovírus provoca infecções do trato respiratório superior em alguns vertebrados.

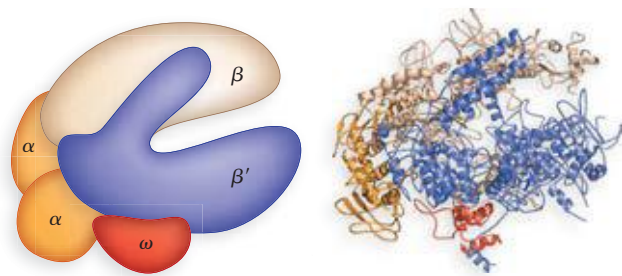



**FIGURA 26-4 Estrutura da holoenzima da RNA-polimerase da bactéria *Thermus aquaticus*** (Derivada da PDB ID 1HQM). A estrutura geral dessa enzima é muito semelhante àquela da RNA-polimerase da *E. coli*; nenhum DNA ou RNA é mostrado aqui. As várias subunidades da RNA-polimerase bacteriana dão à enzima a forma de uma garra de caranguejo. Cada parte da pinça é formada a partir de grandes subunidades $\beta$ e $\beta'$. As subunidades são mostradas com as mesmas cores na estrutura esquemática e em fita.

($\alpha_2\beta\beta'\omega$; $M_r$ 390.000) e uma sexta subunidade, de um grupo denominado $\sigma$, com variantes designadas por tamanho (peso molecular). A subunidade $\sigma$ se liga transitoriamente ao centro e direciona a enzima para sítios de ligação específicos no DNA (descritos a seguir). Essas seis subunidades constituem a holoenzima da RNA-polimerase (**Figura 26-4**). A holoenzima da RNA-polimerase da *E. coli* existe, portanto, em várias formas, dependendo do tipo da subunidade $\sigma$. A subunidade mais comum é a $\sigma^{70}$ ($M_r$ 70.000) e a discussão a seguir foca na holoenzima da RNA-polimerase correspondente.

As RNA-polimerases não apresentam um sítio ativo distinto de exonuclease de revisão $3'\rightarrow5'$ (como aquele de várias DNA-polimerases), e a taxa de erro de transcrição é mais alta do que aquela de replicação do DNA cromossomal – aproximadamente um erro a cada $10^4$ a $10^5$ ribonucleotídeos incorporados ao RNA. Como muitas cópias de um RNA são geralmente produzidas a partir de um único gene e todos os RNA são, por fim, degradados e substituídos, um erro em uma molécula de RNA tem menor consequência para a célula do que um erro na informação permanente armazenada no DNA. Muitas RNA-polimerases, incluindo a RNA-polimerase bacteriana e a RNA-polimerase II de eucariontes (discutida a seguir), pausam realmente quando uma base mal pareada é adicionada durante a transcrição, e elas podem remover os nucleotídeos errados da extremidade 3′ de um transcrito por reversão direta da reação da polimerase. Porém, não se sabe ainda se essa atividade é uma verdadeira função de revisão e em que grau ela pode contribuir para a fidelidade da transcrição.

## A síntese de RNA começa nos promotores

A iniciação da síntese de RNA em pontos aleatórios da molécula de DNA seria um processo de desperdício extraordinário. Em vez disso, uma RNA-polimerase se liga a sequências específicas no DNA chamadas de **promotores**, que dirigem a transcrição de segmentos adjacentes de DNA (genes). As sequências em que as RNA-polimerases se ligam podem ser muito variáveis, e muitas pesquisas tiveram como foco a identificação das sequências particulares que são críticas para a função do promotor.

Na *E. coli*, a ligação da RNA-polimerase ocorre no interior de uma região que se estende desde cerca de 70 pb antes do sítio de início da transcrição até cerca de 30 pb além dele. Por convenção, os pares de bases de DNA que correspondem ao início de uma molécula de RNA recebem números positivos, e aqueles que precedem o sítio do início do RNA recebem números negativos. A região do promotor se estende, portanto, entre as posições –70 e +30. Análises e comparações da classe mais comum de promotores bacterianos (aqueles reconhecidos por uma holoenzima de RNA-polimerase contendo $\sigma^{70}$) revelaram semelhanças em duas sequências curtas centradas em torno das posições –10 e –35 (**Figura 26-5**). Essas sequências são sítios de interação importantes para a subunidade $\sigma^{70}$. Embora as sequências não sejam idênticas em todos os promotores bacterianos nessa classe, certos nucleotídeos particularmente comuns em cada posição formam uma **sequência de consenso** (lembre-se da sequência de consenso *oriC* da *E. coli*; ver Figura 25-10). A sequência de consenso na região –10 é (5′)TATAAT(3′); a sequência de consenso na região –35 é (5′)TTGACA(3′). Um terceiro elemento de reconhecimento rico em AT, chamado de elemento UP (promotor a montante, do inglês *upstream promoter*), ocorre entre as posições –40 e –60 nos promotores de certos genes altamente expressados. O elemento UP é ligado pela subunidade $\alpha$ da RNA-polimerase. A eficiência com que uma RNA-polimerase contendo $\sigma^{70}$ se liga a um promotor e inicia a transcrição é determinada em grande parte por essas sequências, pelo espaçamento entre elas, e pela sua distância do sítio de início de transcrição.

Muitas linhas de evidência independentes atestam a importância funcional das sequências nas regiões –35 e –10. Mutações que afetam a função de um determinado promotor frequentemente envolvem um par de bases nessas regiões. Variações na sequência de consenso também afetam a eficiência da ligação da RNA-polimerase e a iniciação da transcrição. Uma alteração em apenas um par de bases pode diminuir a taxa de ligação em várias ordens de magnitude. A sequência do promotor, portanto, estabelece um nível basal de expressão que pode variar enormemente de um gene de *E. coli* para o seguinte. Um método que fornece informação acerca da interação entre a RNA-polimerase e promotores é ilustrado no Quadro 26-1.

A via de iniciação da transcrição e o destino da subunidade $\sigma$ estão se tornando muito melhor definidos (**Figura 26-6**). A via consiste em duas partes principais, ligação e iniciação, cada qual com múltiplas etapas. Primeiro, a polimerase, dirigida por seu fator ligado $\sigma$, se liga ao promotor. Um complexo fechado (em que o DNA ligado é intacto) e um complexo aberto (em que o DNA ligado está intacto e parcialmente desenrolado próximo da sequência –10) se formam em sucessão. Segundo, a transcrição é iniciada no interior do complexo, levando a uma mudança conformacional que converte o complexo na forma de alongamento, seguida pelo movimento do complexo de transcrição para longe do promotor (distanciamento do promotor). Qual-

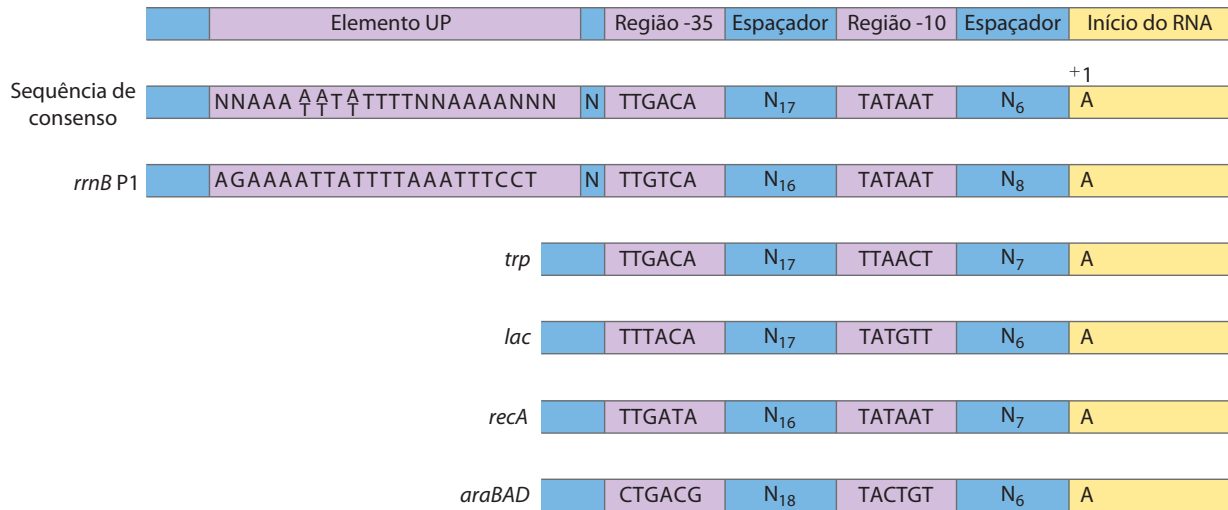



**FIGURA 26-5 Típicos promotores de *E. coli* reconhecidos por uma holoenzima da RNA-polimerase contendo $\sigma^{70}$.** As sequências da fita não molde são mostradas, lidas na direção 5′→3′, como é a convenção para representações deste tipo. As sequências diferem de um promotor para o seguinte, mas comparações de vários promotores revelam semelhanças, particularmente nas regiões −10 e −35. O elemento de sequência UP, não encontrado em todos os promotores de *E. coli*, é mostrado no promotor P1 para o gene de rRNA altamente expressado *rrnB*. Os elementos UP, geralmente encontrados na região entre −40 e −60, estimulam fortemente a transcrição nos promotores que os contêm. O elemento UP no promotor P1 do *rrnB* abrange a região entre −38 e −59. A sequência de consenso para os promotores da *E. coli* reconhecidos como $\sigma^{70}$ é a segunda a partir do topo. Regiões espaçadoras contêm números ligeiramente variáveis de nucleotídeos (N). É mostrado apenas o primeiro nucleotídeo codificando o transcrito de RNA (na posição +1).

quer uma dessas etapas pode ser afetada pela composição específica das sequências promotoras. A subunidade $\sigma$ se dissocia estocasticamente (de modo aleatório) à medida que a polimerase entra na fase de alongamento da transcrição. A proteína NusA ($M_r$ 54.430) se liga à RNA-polimerase em alongamento, competitivamente com a subunidade $\sigma$. Uma vez que a transcrição esteja completa, a NusA se dissocia da enzima, a RNA se dissocia do DNA, e um fator $\sigma$ ($\sigma^{70}$ ou outro) pode novamente se ligar à enzima para iniciar a transcrição.

A *E. coli* tem outras classes de promotores, ligados pelas holoenzimas da RNA-polimerase com subunidades $\sigma$ diferentes (Tabela 26-1). Um exemplo são os promotores dos genes de choque térmico. Os produtos desse conjunto de genes são produzidos em níveis superiores quando a célula recebe uma ameaça, como um aumento repentino de temperatura. A RNA-polimerase se liga aos promotores desses genes apenas quando $\sigma^{70}$ é substituído pela subunidade $\sigma^{32}$ ($M_r$ 32.000), específica para os promotores de choque térmico (ver Figura 28-3). Ao empregar diferentes subunidades $\sigma$, a célula pode coordenar a expressão de conjuntos de genes, permitindo alterações importantes na fisiologia celular. A escolha de quais conjuntos de genes são expressados depende da disponibilidade das várias subunidades $\sigma$, o que, por sua vez, é determinado por vários fatores: taxas reguladas de síntese e degradação, modificações pós-síntese que alternam as entre as formas ativa e inativa das subunidades individuais $\sigma$ e uma classe especializada de proteínas anti-$\sigma$, cada tipo ligando-se e sequestrando uma subunidade $\sigma$ particular (tornando-a indisponível para a iniciação da transcrição).

## A transcrição é regulada em vários níveis

As necessidades para qualquer produto gênico variam com as condições celulares ou estágio de desenvolvimento, e a transcrição de cada gene é cuidadosamente regulada para formar produtos gênicos apenas nas proporções necessárias. A regulação pode ocorrer em qualquer etapa na transcrição, incluindo o alongamento e a terminação. Entretanto, boa parte da regulação é direcionada para a ligação da polimerase e etapas de iniciação da transcrição destacadas na Figura 26-6. Diferenças nas sequências de promotores são apenas um dos vários níveis de controle.

A ligação de proteínas a sequências tanto próximas quanto distantes do promotor também pode afetar os níveis de expressão gênica. A ligação de proteínas pode *ativar* a transcrição ao facilitar tanto a ligação da RNA-polimerase ou etapas mais adiante no processo de iniciação, ou ela pode *reprimir* a transcrição ao bloquear a atividade da polimerase. Em *E. coli*, uma proteína que ativa a transcrição é a **proteína receptora cAMP** (**CRP**), que aumenta a transcrição de genes que codificam enzimas que metabolizam outros açúcares além da glicose quando as células crescem na ausência da mesma. **Repressores** são proteínas que bloqueiam a síntese do RNA em genes específicos. No caso do repressor Lac (Capítulo 28), a transcrição dos genes para as enzimas do metabolismo da lactose é bloqueada quando a lactose está indisponível.

A transcrição é a primeira etapa na complicada e energeticamente intensa via da síntese proteica, de modo que a maior parte da regulação dos níveis de proteína, tanto nas células bacterianas quanto eucariontes, ocorre na transcri-

## QUADRO 26-1 MÉTODOS A RNA-polimerase deixa sua digital em um promotor

***Footprinting***, técnica derivada dos princípios usados no sequenciamento de DNA, identifica as sequências de DNA ligadas por uma proteína particular. Os pesquisadores isolam um fragmento de DNA que acreditam conter sequências reconhecidas por uma proteína ligadora de DNA e marcam radioativamente a extremidade de uma das fitas (Figura Q-1). Eles empregam então reagentes químicos ou enzimáticos para introduzir quebras aleatórias no fragmento de DNA (cerca de uma por molécula).

A separação dos produtos clivados marcados (fragmentos quebrados de vários comprimentos) por eletroforese de alta resolução produz uma escala de bandas radioativas. Em um tubo separado, o procedimento de clivagem é repetido em cópias do mesmo fragmento de DNA na presença da proteína ligadora de DNA. Os pesquisadores então submetem os dois conjuntos de produtos de clivagem à eletroforese e os comparam lado a lado. Um intervalo ("*footprint*") na série de bandas radioativas, derivado da amostra de DNA-proteína, atribuível à proteção do DNA pela proteína ligadora, identifica as sequências que a proteína liga.

A localização precisa do sítio da proteína ligadora pode ser determinada por sequenciamento direto (ver Figura 8-34) de cópias do mesmo fragmento de DNA e incluir as raias de sequenciamento (não mostradas aqui) no mesmo gel com o *footprint*. A Figura Q-2 mostra os resultados do *footprinting* para a ligação da RNA-polimerase a um fragmento de DNA contendo um promotor. A polimerase cobre 60 a 80 pb; a proteção pela enzima ligada inclui as regiões –10 e –35.

Solução de fragmentos idênticos de DNA marcados radioativamente * na extremidade de uma das fitas
5′ 3′ 3′ 5′
DNase I
(+) (−)
Trate com DNase sob condições em que cada fita é cortada uma vez (em média). Nenhum corte é feito na área em que a RNA-polimerasese ligou.
Local do corte da DNase
Isole fragmentos de DNA marcado e desnature. Apenas fitas marcadas são detectadas na próxima etapa
Separe os fragmentos por eletroforese em gel de poliacrilamida e visualize as bandas marcadas radioativamente em filme de raios X
+ −
Fragmento de DNA não cortado
Bandas ausentes indicam onde a RNA-polimerase se ligou ao DNA
Migração do DNA

**FIGURA Q-1** Análise de *footprint* do sítio de ligação da RNA-polimerase em um fragmento de DNA. Experimentos separados são desenvolvidos na presença (+) e ausência (−) da polimerase.

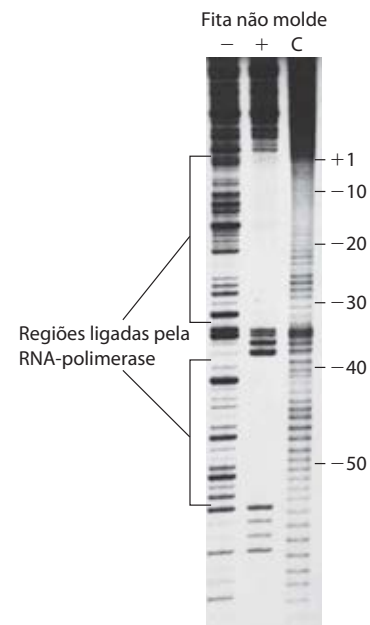



**FIGURA Q-2** Resultados do *footprinting* da RNA-polimerase se ligando ao promotor *lac* (ver Figura 26-5). Nesse experimento, a extremidade 5′ da fita não molde foi marcada radioativamente. A coluna C é um controle em que os fragmentos de DNA marcados foram clivados com um reagente químico que produz um padrão de bandeamento mais uniforme.

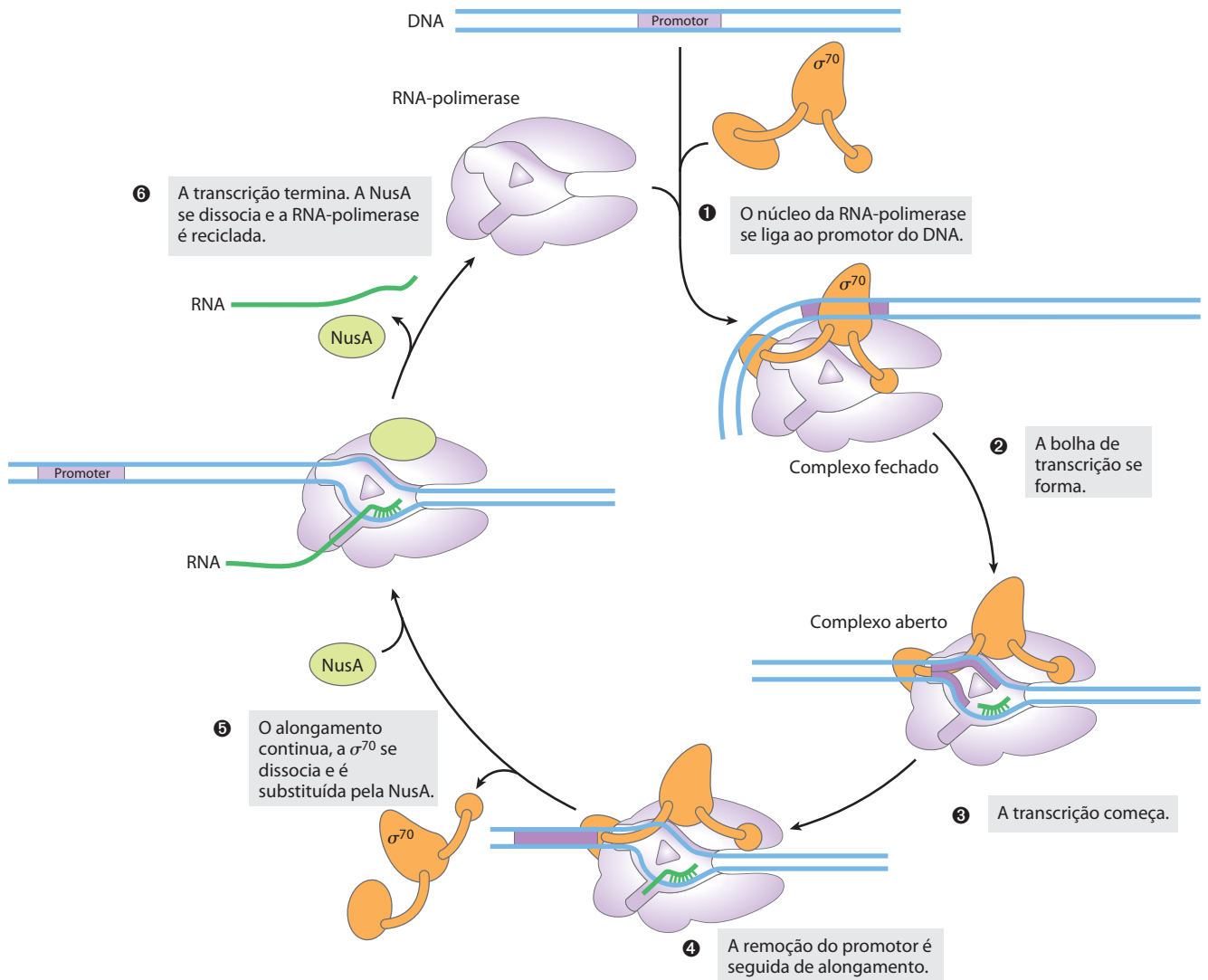



**FIGURA 26-6 Início da transcrição e alongamento pela RNA-polimerase da *E. coli*.** O início da transcrição precisa de várias etapas geralmente divididas em duas fases, ligação e início. Na fase de ligação, a interação inicial da RNA-polimerase com o promotor leva à formação de um complexo fechado, no qual o DNA promotor é ligado de maneira estável, mas não desenrolado. Uma região de 12 a 15 pb de DNA – do interior da região -10 à posição +2 ou +3 – é então desenrolado para formar um complexo aberto. Intermediários adicionais (não mostrados) foram detectados nas vias que levam aos complexos fechados e abertos, junto com várias mudanças na conformação proteica. A fase de iniciação envolve o início da transcrição e a remoção do promotor (etapas ❶ a ❹ aqui). Uma vez que o alongamento tenha começado, a subunidade $\sigma$ é liberada e substituída pela proteína NusA. A polimerase deixa o promotor e fica comprometida com o alongamento do RNA (etapa ❺). Quando a transcrição está completa, o RNA é liberado, a proteína NusA se dissocia e a RNA-polimerase se dissocia do DNA (etapa ❻). Outra subunidade $\sigma$ se liga à RNA-polimerase, e o processo se reinicia.

ção, particularmente em seus estágios iniciais. O Capítulo 28 descreve vários mecanismos pelos quais a regulação é realizada.

## Sequências específicas sinalizam a terminação da síntese de RNA

A síntese de RNA é progressiva; isto é, a RNA-polimerase irá introduzir um grande número de nucleotídeos em uma molécula de RNA crescente antes de se dissociar (p. 1014). Isso é necessário, pois, se uma RNA-polimerase liberasse um transcrito de RNA prematuramente, ela não poderia recomeçar a síntese do mesmo RNA, tendo que, em vez disso, recomeçar. Entretanto, um encontro com certas sequências de DNA resulta em uma pausa na síntese de RNA, e em algumas dessas sequências a transcrição é terminada. O foco aqui é, mais uma vez, nos sistemas bem estudados de bactérias. A *E. coli* tem pelo menos duas classes de sinais de terminação: uma classe se baseia em um fator proteico chamado $\rho$ (rho) e a outra é independente de $\rho$.

**TABELA 26-1** As sete subunidades $\sigma$ de *Escherichia coli*

| Subunidade $\sigma$ | $K_d$ (nM) | Moléculas/ célula* | Fração da holoenzima (%)* | Função |
|---|---|---|---|---|
| $\sigma^{70}$ | 0,26 | 700 | 78 | Manutenção |
| $\sigma^{54}$ | 0,30 | 110 | 8 | Modulação dos níveis de nitrogênio celular |
| $\sigma^{38}$ | 4,26 | <1 | 0 | Genes da fase estacionária |
| $\sigma^{32}$ | 1,24 | <10 | 0 | Genes de choque térmico |
| $\sigma^{28}$ | 0,74 | 370 | 14 | Flagelos e genes de quimiotaxia |
| $\sigma^{24}$ | 2,43 | <10 | 0 | Funções extracitoplasmáticas, algumas funções de choque térmico |
| $\sigma^{18}$ | 1,73 | <1 | 0 | Funções extracitoplasmáticas, incluindo o transporte de citrato férrico |

**Fonte:** Adaptado de Maeda, H., Fujita, N., & Ishihama, A. (2000) *Nucleic Acids* Res. 28, 3500.
**Observação**: Fatores $\sigma$ são amplamente distribuídos em bactérias; o número varia de um único fator $\sigma$ em *Mycoplasma genitalium* a 63 fatores $\sigma$ diferentes em *Streptomyces coelicolor*.
*Número aproximado de cada subunidade $\sigma$ por célula e a fração da holoenzima da RNA-polimerase complexado com cada subunidade durante o crescimento exponencial. Os números mudam à medida que as condições de crescimento se alteram. A fração da RNA-polimerase complexada com cada subunidade $\sigma$ reflete tanto a quantidade de uma subunidade particular quanto sua afinidade pela enzima.

A maioria dos terminadores independentes de $\rho$ tem duas características distintivas. A primeira é uma região que produz um transcrito de RNA com sequências autocomplementares, permitindo a formação de uma estrutura em grampo (ver Figura 8-19a) com 15 a 20 nucleotídeos no centro antes da extremidade projetada da fita de RNA. A segunda característica é um filamento altamente conservado de três resíduos A na fita-molde que são transcritos em resíduos U próximo da extremidade 3′ do grampo. Quando uma polimerase chega a um sítio de terminação com essa estrutura, ela pausa (**Figura 26-7a**). A formação da estrutura em grampo no RNA interrompe vários pares de bases A═U no segmento híbrido de RNA-DNA e pode interromper interações importantes entre o RNA e a RNA-polimerase, facilitando a dissociação do transcrito.

Os terminadores dependentes de $\rho$ não têm a sequência de resíduos repetidos de A na fita-molde, mas em geral incluem uma sequência rica em CA chamada de elemento *rut* (do inglês *r*ho *ut*ilization, "emprego de rho"). A proteína $\rho$ se associa ao RNA em sítios de ligação específicos e migra na direção 5′→3′ até alcançar o complexo de transcrição que é pausado no sítio de terminação (Figura 26-7b). Aqui ela contribui para liberar o transcrito de RNA. A proteína $\rho$ tem uma atividade de helicase de RNA-DNA dependente de ATP que promove a translocação da proteína ao longo do RNA, sendo o ATP hidrolisado pela proteína $\rho$ durante o processo de terminação. O mecanismo detalhado pelo qual a proteína promove a liberação do transcrito de RNA não é conhecido.

## As células eucariontes têm três tipos de RNA-polimerases nucleares

O maquinário da transcrição no núcleo de uma célula eucarionte é muito mais complexo do que em bactérias. Os eucariontes têm três RNA-polimerases, designadas I, II e III, que são complexos distintos, mas que apresentam certas subunidades em comum. Cada polimerase tem uma função específica e é recrutada para uma sequência promotora específica.

A RNA-polimerase I (Pol I) é responsável pela síntese de apenas um tipo de RNA, um transcrito chamado de RNA pré-ribossomal (ou pré-rRNA), que contém o precursor dos rRNA 18S, 5,8S e 28S (ver Figura 26-24). Os promotores da Pol I diferem enormemente de uma espécie para outra. A principal função da RNA-polimerase II (Pol II) é a síntese de mRNA e de alguns RNA especializados. Essa enzima pode reconhecer milhares de promotores que variam enormemente em suas sequências. Alguns promotores da Pol II apresentam algumas sequências em comum, incluindo uma TATA *box* (sequência consenso de eucariontes TATA(A/T)A(A/T)(A/G)) próxima do par de bases –30 e uma sequência Inr (iniciador) próxima do sítio de início do RNA em +1 (**Figura 26-8**). Entretanto, tais promotores estão em minoria, e a Pol II opera em muitos promotores que não apresentam tais sequências características.

A RNA-polimerase III (Pol III) produz tRNA, o rRNA 5S e alguns outros RNA pequenos especializados. Os promotores reconhecidos pela Pol III são bem caracterizados. De modo interessante, algumas das sequências necessárias para o início regulado da transcrição pela Pol III estão localizadas no interior do próprio gene, enquanto outras estão em localizações mais convencionais à montante do sítio de iniciação do RNA (Capítulo 28).

## A RNA-polimerase II precisa de muitos outros fatores proteicos para a sua atividade

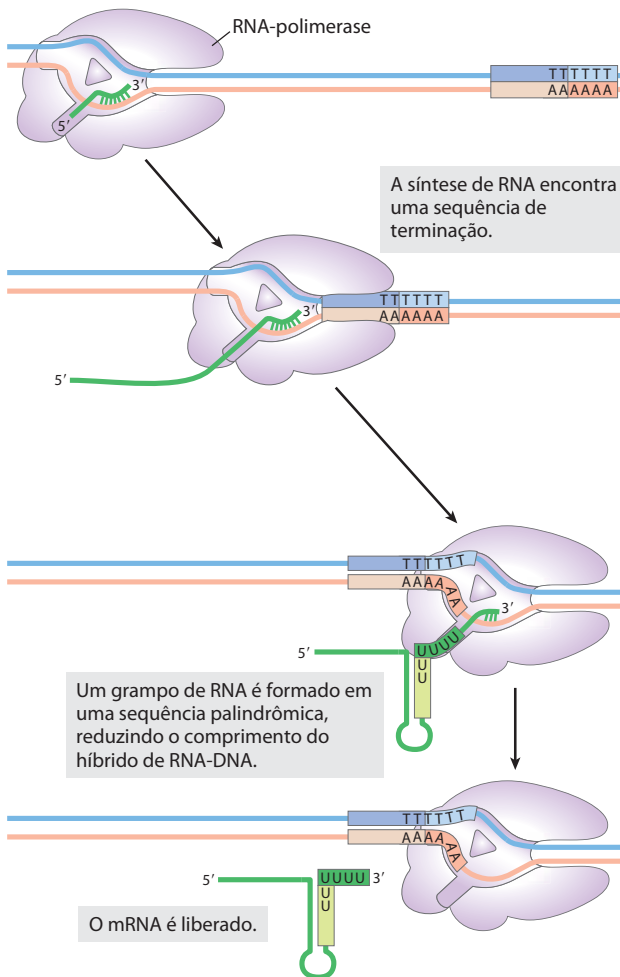
A RNA-polimerase II é central para a expressão gênica de eucariontes e tem sido extensamente estudada. Embora essa polimerase seja surpreendentemente mais complexa do que a sua contraparte bacteriana, a complexidade mascara uma impressionante conservação da estrutura, função e mecanismo. A Pol II isolada da levedura é uma enzima imensa com 12 subunidades. A maior subunidade (RBP1) apresenta um alto grau de homologia com a subunidade $\beta'$

**(a) Terminação independente de ρ**

RNA-polimerase

A síntese de RNA encontra uma sequência de terminação.

Um grampo de RNA é formado em uma sequência palindrômica, reduzindo o comprimento do híbrido de RNA-DNA.

O mRNA é liberado.

**(b) Terminação dependente de ρ**

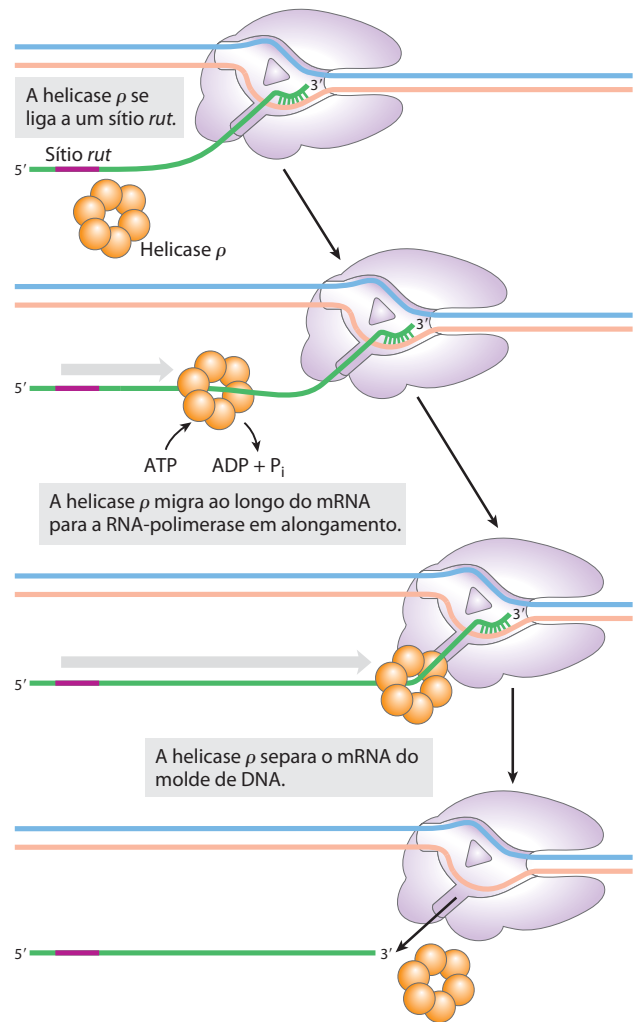



**FIGURA 26-7 Terminação da transcrição em *E. coli*. (a)** Terminação independente de ρ. A RNA-polimerase pausa a transcrição em várias sequências de DNA, algumas das quais são terminadoras. Um de dois resultados é então possível: a polimerase evita o sítio e continua no seu caminho, ou o complexo sofre uma mudança conformacional (isomerização). Nesse último caso, o pareamento intramolecular de sequências complementares no transcrito de RNA recém-formado pode formar um grampo que rompe o híbrido RNA-DNA ou as interações entre o RNA e a polimerase, ou ambos, resultando em isomerização. Uma região híbrida A═U na extremidade 3′ do novo transcrito é relativamente instável, e o RNA se dissocia do complexo completamente, levando à terminação. Esse é o resultado comum nos terminadores. Em outros sítios de pausa, o complexo pode escapar após a etapa de isomerização para continuar a síntese de RNA. **(b)** Terminação dependente de ρ. Os RNAs que incluem um sítio *rut* (roxo) recrutam a helicase ρ. A helicase migra ao longo do mRNA na direção 5′→3′ e se separa da polimerase.

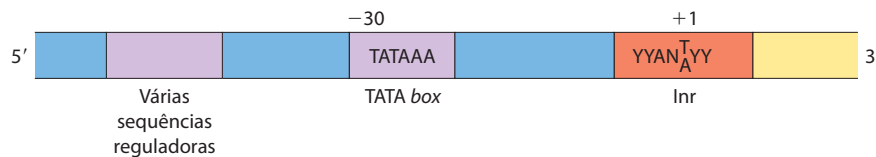



**FIGURA 26-8 Algumas sequências comuns em promotores reconhecidos pela RNA-polimerase II.** A TATA *box* é o principal ponto de reunião para as proteínas dos complexos de pré-iniciação de Pol II. O DNA é desenrolado na sequência iniciadora (Inr), e o sítio de início de transcrição é geralmente no interior dessa sequência ou muito próximo dela. Na sequência de consenso Inr mostrada aqui, N representa qualquer nucleotídeo; Y, nucleotídeo de pirimidina. Muitas sequências adicionais servem como sítios de ligação para uma grande variedade de proteínas que afetam a atividade da Pol II. Essas sequências são importantes na regulação dos promotores Pol II e diferem enormemente em tipo e número, e em geral o promotor de eucariontes é muito mais complexo do que sugerido aqui (ver Figura 15-25). Muitas das sequências estão localizadas no interior de algumas poucas centenas de pares de bases da TATA *box* no lado 5′; outras podem estar a milhares de pares de bases de distância. Os elementos de sequência resumidos aqui são mais variáveis entre os promotores da Pol II de eucariontes do que entre os promotores de *E. coli* (ver Figura 26-5). A maioria dos promotores da Pol II não tem TATA *box*, elemento de consenso Inr ou ambos. Sequências adicionais em torno da TATA *box* e abaixo (para a direita como desenhado) do Inr podem ser reconhecidas por um ou mais fatores de transcrição.

**TABELA 26-2** Proteínas necessárias para iniciação da transcrição nos promotores da RNA-polimerase II (Pol II) de eucariontes

| Proteína de transcrição | Número de subunidades | Subunidade(s) $M_r$ | Função(ões) |
|---|---|---|---|
| **Iniciação** | | | |
| Pol II | 12 | 10.000 – 220.000 | Catalisa a síntese de RNA |
| TBP (proteína ligadora do TATA) | 1 | 38.000 | Reconhece especificamente a TATA *box* |
| TFIIA | 3 | 12.000, 19.000, 35.000 | Estabiliza a ligação do TFIIB e TBP ao promotor |
| TFIIB | 1 | 35.000 | Liga-se ao TBP; recruta o complexo Pol II-TFIIF |
| TFIIE | 2 | 34.000, 57.000 | Recruta o TFIIH; tem atividades de ATPase e helicase |
| TFIIF | 2 | 30.000, 74.000 | Se liga fortemente à Pol II; se liga à TFIIB e impede a ligação da Pol II às sequências de DNA não específicas |
| TFIIH | 12 | 35.000 – 89.000 | Desenrola o DNA no promotor (atividade de helicase); fosforila a Pol II (no interior do CTD); recruta proteínas de reparo de excisão de nucleotídeos |
| **Alongamento*** | | | |
| ELL[†] | 1 | 80.000 | |
| pTEFb | 2 | 43.000, 124.000 | Fosforila a Pol II (no interior do CTD) |
| SII (TFIIS) | 1 | 38.000 | |
| Elonguina (SIII) | 3 | 15.000, 18.000, 110.000 | |

*A função de todos os fatores de alongamento é a de suprimir a pausa ou interrupção da transcrição pelo complexo Pol II-TFIIF.
[†]Nome derivado da leucemia rica em lisina 11-19. O gene para ELL é o local dos eventos de recombinação cromossomal frequentemente associados à leucemia mieloide aguda.

da RNA-polimerase bacteriana. Outra subunidade (RBP2) é estruturalmente semelhante à subunidade bacteriana $\beta$, e duas outras (RBP3 e RBP11) exibem algum grau de homologia estrutural em relação às duas subunidades $\alpha$ bacterianas. A Pol II deve funcionar com genomas mais complexos e com moléculas de DNA mais elaboradamente acondicionadas do que nas bactérias. A necessidade de contatos proteína-proteína com os outros numerosos fatores proteicos necessários para navegar esse labirinto é responsável em grande medida pela complexidade adicional da polimerase de eucariontes.

A maior subunidade de Pol II (RBP1) também tem uma característica incomum, uma longa cauda de carboxila terminal consistindo em várias repetições de uma sequência de consenso héptade de aminoácidos –YSPTSPS–. Há 27 repetições na enzima de levedura (18 exatamente correspondentes ao consenso) e 52 (21 exatos) nas enzimas de camundongos e de humanos. Esse domínio carboxiterminal (CTD) é separado do corpo principal da enzima por uma sequência ligadora inerentemente não estruturada. A CTD tem vários papéis importantes na função da Pol II, como destacado a seguir.

A RNA-polimerase II requer uma série de outras proteínas, chamadas de **fatores de transcrição**, a fim de formar o complexo de transcrição ativo. Os **fatores de transcrição gerais** necessários a cada promotor da Pol II (fatores geralmente designados TFII com um identificador adicional) são altamente conservados em todos os eucariontes (Tabela 26-2). O processo de transcrição pela Pol II pode ser descrito em termos de várias fases – montagem, iniciação, alongamento, terminação – cada uma associada a proteínas características (**Figura 26-9**). A via passo a passo descrita a seguir leva à transcrição ativa *in vitro*. Na célula, várias das proteínas podem estar presentes em complexos maiores pré-montados, simplificando as vias para montagem de promotores. À medida que lê sobre esse processo, consulte a Figura 26-9 e a Tabela 26-2 para ajudar a acompanhar os muitos participantes.

**FIGURA 26-9 Transcrição nos promotores da RNA-polimerase II. (a)** A reunião sequencial de TBP (frequentemente com TFIIA), TFIIB, TFIIF mais Pol II, TFIIE e TFIIH resulta em um complexo fechado. No interior do complexo, o DNA é desenrolado na região Inr pela atividade de helicase do TFIIH e talvez do TFIIE, criando um complexo aberto. O domínio da terminação carboxila da maior subunidade de Pol II é fosforilado por TFIIH e a polimerase então escapa do promotor e começa a transcrição. O alongamento é acompanhado pela liberação de vários fatores de transcrição e também é estimulado por fatores de alongamento (ver Tabela 26-2). Após a terminação, a Pol II é liberada, desfosforilada e reciclada. **(b)** TBP humano ligado ao DNA é dobrado nesse complexo, abrindo o sulco menor a fim de permitir ligações de hidrogênio específicas entre proteínas e o DNA (PDB ID 1TGH). **(c)** Uma visão em corte do alongamento da transcrição promovido pela enzima do núcleo da Pol II.

(a)
5′
3′
TATA
Inr
DNA
−30
+1
(e/ou TFIIA)
TBP
TFIIF
Pol II
TFIIB
TFIIE
TFIIH
1 A Pol II é recrutada para o DNA por fatores de transcrição.
Complexo de pré-iniciação II (fechado)
TFIIB
TFIIF
TATA
TBP
TFIIE
Inr
TFIIA
Pol II
TFIIH
2 A bolha de transcrição se forma.
Complexo de iniciação (aberto)
TATA
A transcrição começa
DNA desenrolado
CTD
TFIIE
TFIIH
Complexo de alongamento
TATA
Inr
RNA
P
3 O CTD é fosforilado durante a iniciação. A polimerase escapa do promotor
Fatores de alongamento
4 O alongamento da transcrição é auxiliado por fatores de alongamento depois que o TFIIE e o TFIIH se dissociam.
Complexo de terminação
TATA
Inr
RNA
5 Fatores de alongamento se dissociam. O CTD é desfosforilado à medida que a transcrição termina, um processo facilitado por fatores de terminação.
Fatores de terminação
Fatores de alongamento
(b)
TBP
(c)
DNA entrando (a jusante)
DNA transcrito (a montante)
Saída do RNA
Mg2+
Sítio ativo
NTPs
RNA-polimerase II

**Montagem da RNA-polimerase e fatores de transcrição em um promotor** A formação de um complexo fechado se inicia quando a proteína de ligação TATA (TBP) se liga à TATA *box* (Figuras 26-9a, etapa ❶ e 26-9b). Nos promotores que não apresentam uma TATA *box*, a TBP se faz presente como parte de um complexo multissubunidade chamado TFIID (não mostrado na Figura 26-9). Os elementos de sequência que dirigem a ligação da TFIID nos promotores sem TATA são muito pouco conhecidos. A TBP, por sua vez, é ligada pelo fator de transcrição TFIIB, que também se liga ao DNA de qualquer lado da TBP. A TFIIA se liga, e, junto com a TFIIB, ajuda a estabilizar o complexo TBP-DNA. A TFIIB fornece uma ligação importante para a DNA-polimerase II e o complexo TFIIB-TBP é em seguida ligado por outro complexo consistindo na TFIIF e Pol II. A TFIIF ajuda a ligar a Pol II aos seus promotores, tanto pela interação com a TFIIB quanto reduzindo a ligação da polimerase a sítios inespecíficos no DNA. Finalmente, a TFIIE e a TFIIH se ligam para criar o complexo fechado. A TFIIH tem múltiplas subunidades e inclui uma atividade de helicase de DNA que promove o desenrolamento do DNA próximo do sítio de início do RNA (um processo que requer a hidrólise de ATP), criando assim um complexo aberto. (Figura 26-9a, etapa ❷). Somando todas as subunidades dos vários fatores essenciais (excluindo o TFIIA e algumas subunidades de TFIID), essa reunião ativa mínima tem mais de 30 polipeptídeos. Estudos estruturais por Roger Kornberg e colaboradores forneceram uma visão mais detalhada da estrutura central da RNA-polimerase II durante o alongamento (Figura 26-9c).

**Iniciação da fita de RNA e distanciamento do promotor** A TFIIH tem uma função adicional durante a fase de iniciação. A atividade de cinase em uma de suas subunidades fosforila a Pol II em muitos locais no CTD (Figura 26-9a). Várias outras proteínas cinases, incluindo a CDK9 (cinase 9 dependente de ciclina), que é parte do complexo pTEFb (fator positivo b de alongamento de transcrição), também fosforilam o CTD, principalmente nos resíduos de Ser da sequência de repetição do CTD. Isso provoca uma mudança conformacional geral no complexo, iniciando a transcrição. A fosforilação do CTD também é importante durante a fase de alongamento subsequente, com o estado de fosforilação do CTD mudando à medida que a transcrição prossegue. As mudanças afetam as interações entre o complexo de transcrição e outras proteínas e enzimas, de modo que diferentes conjuntos de proteínas são ligados na iniciação em vez de em estágios posteriores. Algumas dessas proteínas estão envolvidas no processamento do transcrito (como descrito a seguir).

Durante a síntese dos 60 a 70 nucleotídeos iniciais de RNA, primeiro a TFIIE e então a TFIIH são liberadas, e a Pol II entra na fase de alongamento da transcrição.

**Alongamento, terminação e liberação** A TFIIF permanece associada à Pol II durante o alongamento. Durante esse estágio, a atividade da polimerase é bastante estimulada por proteínas chamadas de fatores de alongamento (Tabela 26-2). Os fatores de alongamento, alguns ligados ao CTD fosforilado, impedem a pausa durante a transcrição e também coordenam as interações entre complexos de proteínas envolvidos no processamento pós-transcricional de mRNA. Uma vez que o transcrito de RNA esteja completo, a transcrição é encerrrada. A Pol II é desfosforilada e reciclada, pronta para iniciar outro transcrito (Figura 26-9a, etapas ❸ a ❺).

**Regulação da atividade da RNA-polimerase II** A regulação da transcrição nos promotores da Pol II é muito elaborada. Ela envolve a interação de uma grande variedade de outras proteínas com o complexo de pré-iniciação. Algumas dessas proteínas regulatórias interagem com fatores de transcrição, outras com a própria Pol II. A regulação da transcrição é descrita em mais detalhe no Capítulo 28.

**Diversas funções da TFIIH** Em eucariontes, o reparo de DNA danificado (Tabela 25-5) é mais eficiente dentro de genes que estão sendo transcritos ativamente do que em outros DNA danificados, e a fita-molde é reparada de maneira mais eficiente do que a fita não molde. Essas observações impressionantes são explicadas pelos papéis alternativos das subunidades TFIIH. A TFIIH não só participa na formação do complexo fechado durante a montagem de um complexo de transcrição (como descrito anteriormente), mas algumas de suas unidades são também componentes essenciais do complexo de reparo separado de excisão de nucleotídeos (ver Figura 25-25).

Quando a transcrição da Pol II para no local de uma lesão de DNA, a TFIIH pode interagir com a lesão e recrutar todo o complexo de reparo de excisão de nucleotídeos. A perda genética de certas subunidades TFIIH pode produzir doenças humanas. Alguns exemplos são o xeroderma pigmentoso (ver Quadro 25-1) e a síndrome de Cockayne, caracterizada por interrupção do crescimento, fotossensibilidade e distúrbios neurológicos. ■

## A RNA-polimerase DNA-dependente sofre inibição seletiva

O alongamento das fitas de DNA pela RNA-polimerase tanto em bactérias quanto em eucariontes é inibido pelo antibiótico **actinomicina D** (**Figura 26-10**). A porção planar dessa molécula se insere (intercala) no DNA de dupla-hélice entre pares de bases G≡C sucessivos, deformando o DNA. Isso impede o movimento da polimerase ao longo do molde. Como a actinomicina D inibe o alongamento de RNA em células intactas, bem como em extratos celulares, ela é usada para identificar processos celulares que dependem da síntese de RNA. A **acridina** inibe a síntese de RNA de modo semelhante.

A **rifampicina** inibe a síntese bacteriana de RNA ao se ligar à subunidade $\beta$ das RNA-polimerases bacterianas, impedindo a etapa da transcrição de distanciamento do promotor (Figura 26-6). Algumas vezes é usada como antibiótico.

O cogumelo *Amanita phalloides* tem um mecanismo de defesa muito eficiente contra predadores. Ele produz **$\alpha$-amanitina**, que interrompe a formação de mRNA nas células animais ao bloquear a Pol II e, em concentrações mais altas, a Pol III. Nem a Pol I nem a RNA-polimerase bacteria-

Actinomicina D

Acridina

(a)

(b)

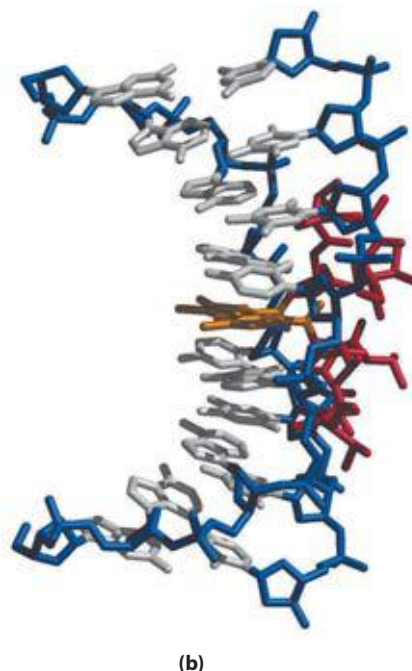
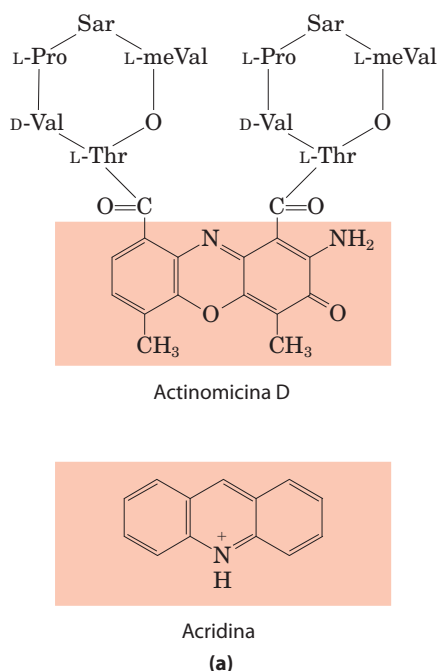



**FIGURA 26-10 Actinomicina D e acridina, inibidores da transcrição do DNA. (a)** A porção sombreada da actinomicina D é planar e se intercala entre dois pares de bases sucessivos G≡C em um DNA duplex. As duas unidades de peptídeos cíclicos da actinomicina D se ligam ao sulco menor da dupla-hélice. Sarcosina (Sar) é *N*-metilglicina; meVal é metilvalina. A acridina também atua por intercalação no DNA. **(b)** Um complexo de actinomicina D com DNA (PDB ID 1DSC). O esqueleto de DNA é mostrado em azul, as bases são brancas, a parte intercalada da actinomicina (sombreada em (a)) é cor de laranja, e o resto da actinomicina está em vermelho. O DNA é curvado como resultado da ligação da actinomicina.

na é sensível à $\alpha$-amanitina – nem o é a RNA-polimerase II do próprio *A. phalloides*!

### RESUMO 26.1 Síntese de RNA dependente de DNA

- A transcrição é catalisada por RNA-polimerases dependentes de DNA, que usam ribonucleosídeo 5′-trifosfatos para sintetizar RNA complementar à fita-molde do DNA duplex. A transcrição ocorre em várias fases: ligação da RNA-polimerase a um sítio de DNA chamado promotor, iniciação da síntese do transcrito, alongamento e terminação.
- A RNA-polimerase bacteriana precisa de uma subunidade especial para reconhecer o promotor. Como primeiro passo envolvido na transcrição, a ligação da RNA-polimerase ao promotor e a iniciação da transcrição são intimamente regulados. A transcrição para em sequências chamadas terminadores.
- As células eucarióticas têm três tipos de RNA-polimerases. A ligação da RNA-polimerase II aos seus promotores precisa de um conjunto de proteínas chamadas de fatores de transcrição. Os fatores de alongamento participam na fase de alongamento da transcrição. A maior subunidade de Pol II tem um longo domínio carboxil-terminal, que é fosforilado durante as fases de iniciação e alongamento.

## 26.2 Processamento de RNA

Muitas das moléculas de RNA em bactérias e praticamente todas as moléculas de RNA em eucariontes são processadas em algum grau após a síntese. Alguns dos eventos moleculares mais interessantes no metabolismo de RNA ocorrem durante esse processamento pós-síntese. De modo intrigante, várias das enzimas que catalisam essas reações consistem em RNA em vez de proteína. A descoberta desses RNAs catalíticos, ou **ribozimas**, trouxe uma revolução no pensamento a respeito da função do RNA e acerca da origem da vida.

Uma molécula de RNA recém-sintetizada é chamada de um **transcrito primário**. Talvez o mais extenso processamento de transcritos primários ocorra nos mRNA de eucariontes e em tRNA tanto de bactérias quanto de eucariontes. Os RNAs de função especial também são processados.

O transcrito primário para um mRNA eucarionte geralmente contém sequências envolvendo um gene, embora as sequências codificando o polipeptídeo possam não ser contíguas. Trechos não codificantes que interrompem a região codificadora do transcrito são chamados íntrons e os segmentos codificadores são chamados de éxons (ver discussão de íntrons e éxons no DNA no Capítulo 24). Em um processo chamado ***splicing* de RNA**, os íntrons são removidos do transcrito primário e os éxons são ligados para formar uma sequência contínua que especifica um polipeptídeo funcional. Os mRNAs de eucariontes também são modificados em cada extremidade. Um resíduo modificado chamado de quepe 5′ é adicionado à extremidade 5′. A extremidade 3′ é clivada e 80 a 250 resíduos A são adicionados para criar uma "cauda" poli(A). Os complexos proteicos algumas vezes elaborados que executam cada uma dessas três reações de processamento de mRNA não operam independentemente. Eles parecem ser organizados em associação uns com os outros e com o CTD fosforilado da Pol II; cada complexo afeta a função dos outros. As proteínas envolvidas no transporte de mRNA para o citoplasma também são associadas ao mRNA no núcleo, e o processamento do transcrito é acoplado ao seu transporte. De fato, um mRNA eucarionte, à medida que é sintetizado, é codificado em um complexo elaborado envolvendo dúzias de proteínas.

A composição do complexo varia à medida que o transcrito primário é processado, transportado para o citoplasma e entregue ao ribossomo para tradução. As proteínas associadas modulam todos os aspectos da função e destino do mRNA. Esses processos são destacados na **Figura 26-11** e descritos em mais detalhe a seguir.

Os transcritos primários dos tRNAs bacteriano e de eucariontes são processados pela remoção de sequências de cada extremidade (clivagem) e em alguns poucos casos pela remoção dos íntrons (*splicing*). Muitas bases e açúcares em tRNAs também são modificados; tRNAs maduros são repletos de bases incomuns não encontradas em outros ácidos nucleicos (ver Figura 26-22). Muitos dos RNA de função especial também passam por processamento elaborado, frequentemente envolvendo a remoção de segmentos de uma ou ambas extremidades.

O destino final de qualquer RNA é sua completa e controlada degradação. A taxa de reposição dos RNA desempenha um papel crítico na determinação dos seus níveis estacionários e a taxa na qual as células podem interromper a expressão de um gene cujo produto não é mais necessário. Durante o desenvolvimento de organismos multicelulares, por exemplo, certas proteínas devem ser expressas apenas em um estágio, e o mRNA que codifica tal proteína deve ser produzido e destruído nos tempos adequados.

## Os mRNAs de eucariontes recebem um quepe na extremidade 5′

A maioria dos mRNAs de eucariontes tem um **quepe 5′**, um resíduo de 7-metilguanosina ligado ao resíduo do terminal 5′

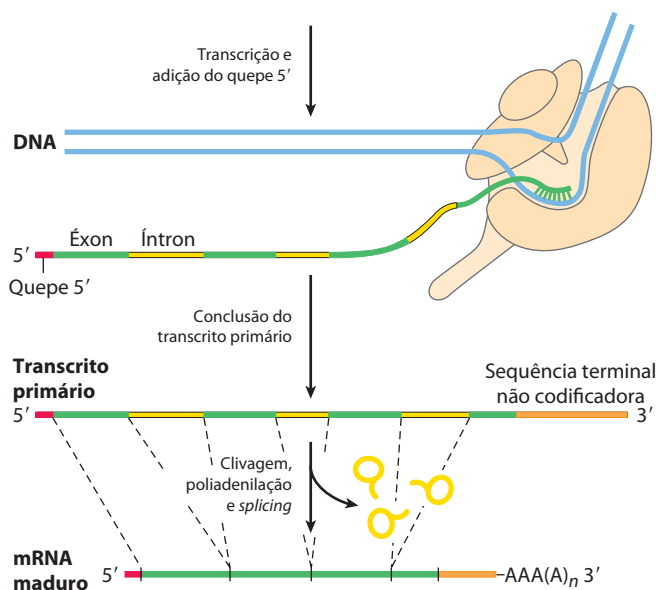



**FIGURA 26-11 Formação do transcrito primário e seu processamento durante a maturação do mRNA em uma célula eucarionte.** O quepe 5′ (vermelho) é adicionado antes que a síntese do transcrito primário esteja completa. Uma sequência terminal não codificadora (íntron) é mostrada em cor de laranja após o último éxon. O *splicing* pode ocorrer tanto antes quanto depois das etapas de clivagem e poliadenilação. Todos os processos aqui mostrados ocorrem no núcleo.

do mRNA por meio de uma rara ligação trifosfato 5′,5′-trifosfato (**Figura 26-12**). O quepe 5′ ajuda a proteger o mRNA das ribonucleases. Ele também se liga a um complexo de proteínas ligadoras de quepe específico e participa da ligação do mRNA ao ribossomo para iniciar a tradução (Capítulo 27).

O quepe 5′ é formado pela condensação de uma molécula de GTP com o trifosfato na extremidade 5′ do transcrito. Em seguida, a guanina é metilada no N-7, e grupos metil adicionais são frequentemente adicionados às hidroxilas 2′ do primeiro e segundo nucleotídeos adjacentes ao quepe (Figura 26-12a). Os grupos metil são derivados da *S*-adenosilmetionina. Todas essas reações ocorrem logo no início da transcrição, após a adição dos primeiros 20 a 30 nucleotídeos do transcrito. Todas as três enzimas de *adição do quepe*, e, por meio delas, a extremidade 5′ do próprio transcrito, são associadas ao CTD da RNA-polimerase II até que o quepe seja sintetizado. A extremidade 5′ com quepe é então liberada das enzimas de adição do quepe e ligada pelo complexo ligador de quepe (Figura 26-12c).

## Tanto íntrons quanto éxons são transcritos de DNA para RNA

Em bactérias, uma cadeia polipeptídica é geralmente codificada por uma sequência de DNA que é colinear com a sequência de aminoácido, continuando ao longo do molde de DNA sem interrupção até que a informação necessária para especificar o polipeptídeo seja completa. Entretanto, a noção de que *todos* os genes sejam contínuos foi desmentida em 1977 quando Phillip Sharp e Richard Roberts descobriram independentemente que muitos genes para polipeptídeos em eucariontes são interrompidos por sequências não codificadoras (íntrons).

A grande maioria dos genes em vertebrados contém íntrons; entre as poucas exceções estão aqueles que codificam histonas. A ocorrência de íntrons em outros eucariontes varia. Muitos genes na levedura *Saccharomyces cerevisiae* não apresentam íntrons, embora em algumas outras espécies de leveduras os íntrons sejam mais comuns. Os íntrons também são encontrados em alguns poucos genes bacterianos e de arqueobactérias. Os íntrons do DNA são transcritos junto com o resto do gene pelas RNA-polimerases. Os íntrons no transcrito de RNA primário sofrem *splicing*, e os éxons são então ligados para formar um RNA maduro funcional. Em mRNA de eucariontes, a maioria dos éxons tem menos de 1.000 nucleotídeos de comprimento, com vários na faixa de tamanho de 100 a 200 nucleotídeos, codificando trechos de 30 a 60 aminoácidos no interior de um polipeptídeo mais longo. Os íntrons variam de tamanho de 50 a 20.000 nucleotídeos. Os genes dos eucariontes superiores, incluindo humanos, têm caracteristicamente muito mais DNA destinado a íntrons do que a éxons. Muitos genes têm íntrons; alguns têm dúzias deles.

## O RNA catalisa o *splicing* de íntrons

Há quatro classes de íntrons. As primeiras duas, os íntrons do grupo I e do grupo II, diferem em detalhes dos seus mecanismos de *splicing*, mas compartilham uma característica surpreendente: eles sofrem *autosplicing* – nenhuma enzima proteica está envolvida. Os íntrons do grupo I são

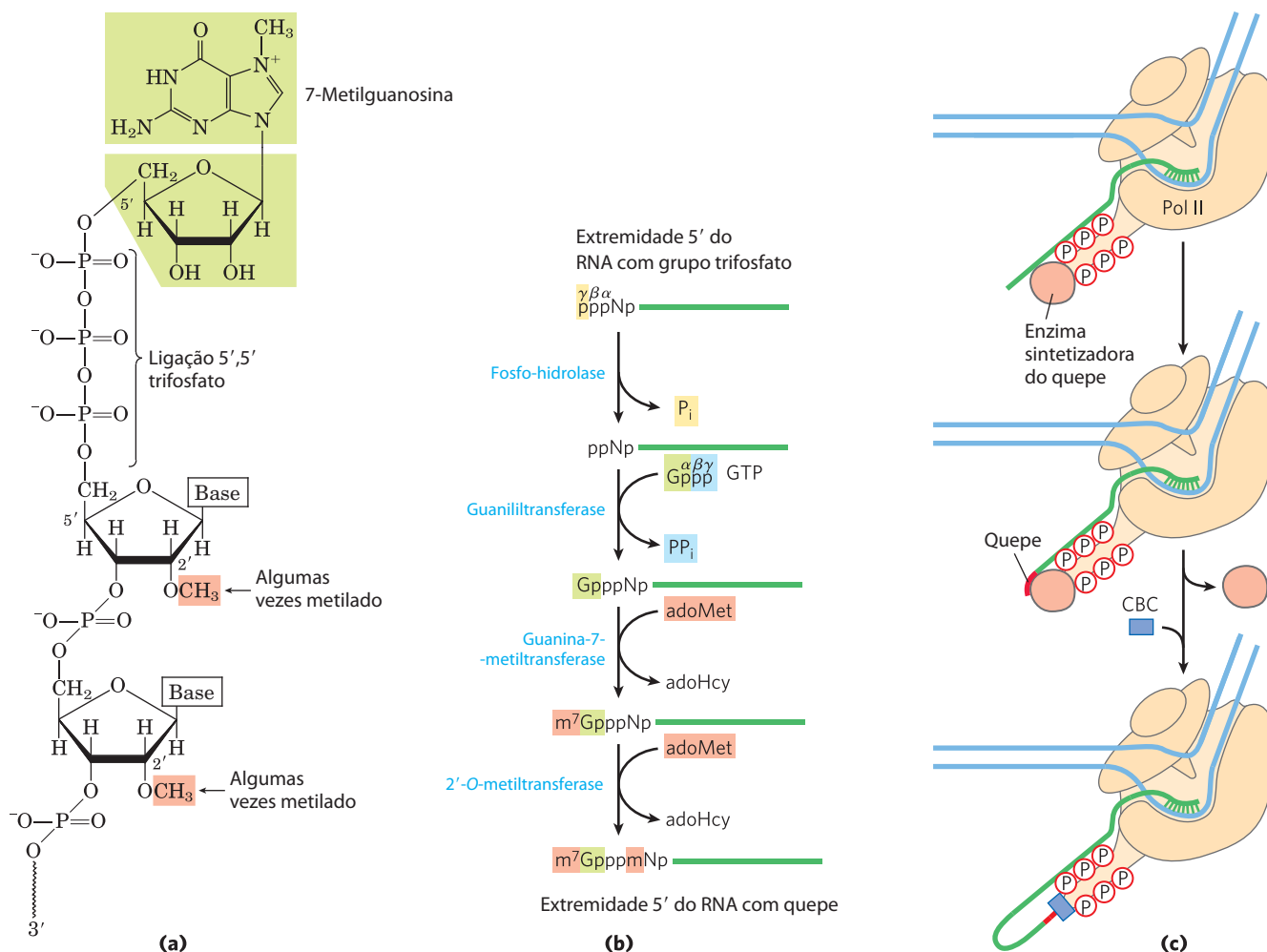



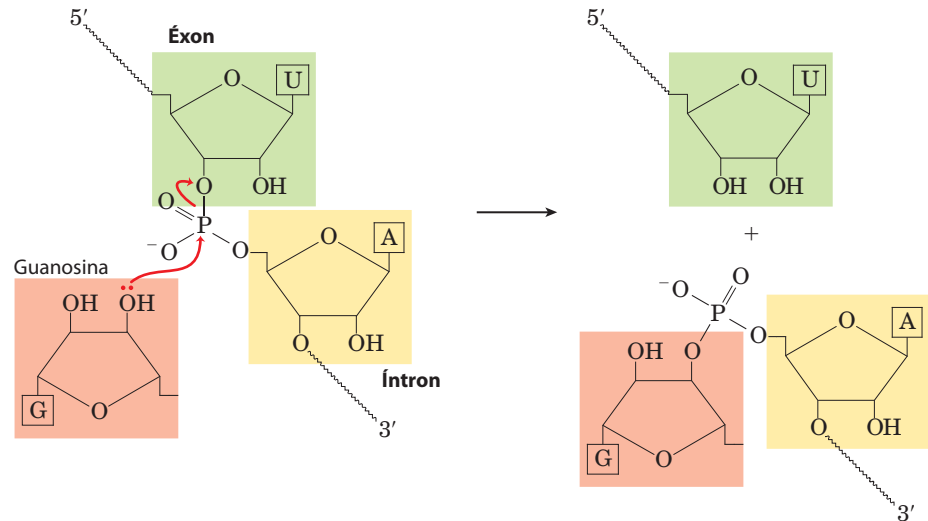
**FIGURA 26-12 O quepe 5′ do mRNA. (a)** A 7-metilguanosina ($m^7G$) é ligada à extremidade 5′ de quase todos os mRNAs de eucariontes em uma ligação incomum 5′,5′-trifosfato. Os grupos metil (cor salmão) são frequentemente encontrados na posição 2′ do primeiro e segundo nucleotídeos. Os RNAs em células de leveduras não apresentam os grupos metil 2′. O grupo metil 2′ no segundo nucleotídeo é geralmente encontrado apenas em RNA de células de vertebrados. **(b)** A produção do quepe 5′ envolve quatro a cinco etapas separadas (adoHcy é S-adenosil-homocisteína). **(c)** A síntese do quepe é feita por enzimas presas ao CTD da Pol II. O quepe permanece preso ao CTD por meio de uma associação com o complexo de ligação do quepe (CBC).

encontrados em alguns genes nucleares, mitocondriais e de cloroplastos que codificam rRNAs, mRNAs e tRNAs. Íntrons do grupo II são geralmente encontrados em transcritos primários de mRNAs mitocondriais ou de cloroplastos em fungos, algas e plantas. Os íntrons do grupo I e grupo II também são encontrados entre os raros exemplos de íntrons em bactérias. Nenhuma das classes precisa de um cofator de alta energia (tal como o ATP) para o *splicing*. Os mecanismos de *splicing* em ambos os grupos envolvem duas etapas de reações de transesterificação (**Figura 26-13**), em que um grupo ribose 2′ ou 3′-hidroxila faz um ataque nucleofílico em um fósforo e uma nova ligação fosfodiéster é formada às custas da antiga, mantendo o equilíbrio de energia. Essas reações são muito semelhantes às reações de quebra e religação do DNA promovidas pelas topoisomerases (ver Figura 24-20) e recombinases sítio-específicas (ver Figura 25-37).

A reação de *splicing* do grupo I precisa de um nucleosídeo guanina ou de um cofator nucleotídeo, mas o cofator não é usado como uma fonte de energia; em vez disso, o grupo 3′-hidroxila da guanosina é usado como um nucleófilo na primeira etapa da via do *splicing*. O grupo 3′-hidroxila da guanosina forma uma ligação 3′,5′-fosfodiéster normal com a extremidade 5′ do íntron (**Figura 26-14**). A 3′-hidroxila do éxon que é deslocada nessa etapa age então como um nucleófilo em uma reação semelhante na extremidade 3′ do íntron. O resultado é a remoção precisa do íntron e ligação dos éxons.

Nos íntrons do grupo II, o padrão de reação é semelhante exceto pelo nucleófilo na primeira etapa, que nesse caso é o grupo 2′-hidroxila de um resíduo A *dentro* do íntron (**Figura 26-15**). Uma estrutura em laço ramificado é formada como um intermediário.

Íntrons que sofrem *autosplicing* foram descobertos pela primeira vez em 1982 em estudos do mecanismo de *splicing* do íntron do grupo I do rRNA do protozoário ciliado *Tetrahymena thermophila*, realizado por Thomas Cech e colaboradores. Esses pesquisadores transcreveram

**FIGURA 26-13 Reação de transesterificação.** É mostrada aqui a primeira etapa do *splicing* de duas etapas dos íntrons do grupo I. Nesse exemplo, a OH 3′ de uma molécula de guanosina atua como um nucleófilo, atacando a ligação fosfodiéster entre os resíduos U e A em uma junção éxon-íntron de uma molécula de mRNA (ver Figura 26-14).

Thomas Cech

o DNA isolado de *Tetrahymena* (incluindo o íntron) *in vitro* usando a RNA-polimerase bacteriana purificada. O RNA resultante sofreu *autosplicing* de modo preciso sem quaisquer proteínas enzimáticas da *Tetrahymena*. A descoberta de que os RNA poderiam ter funções catalíticas foi um marco histórico na nossa compreensão dos sistemas biológicos.

A maioria dos íntrons *não* sofre *autosplicing* e esses tipos não são designados com um número de grupo. A terceira e maior classe de íntrons inclui aqueles encontrados nos transcritos primários de mRNA nuclear. São chamados de **íntrons do *spliceossomo***, pois sua remoção é catalisada por um grande complexo proteico chamado ***spliceossomo*** e ocorre no seu interior. Dentro do *spliceossomo*, os íntrons sofrem *splicing* pelo mesmo mecanismo formador de laço que os íntrons do grupo II. O *spliceossomo* é composto por complexos de RNA-proteínas especializados, pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNP, frequentemente pronunciada "*snurp*"). Cada snRNP contém uma

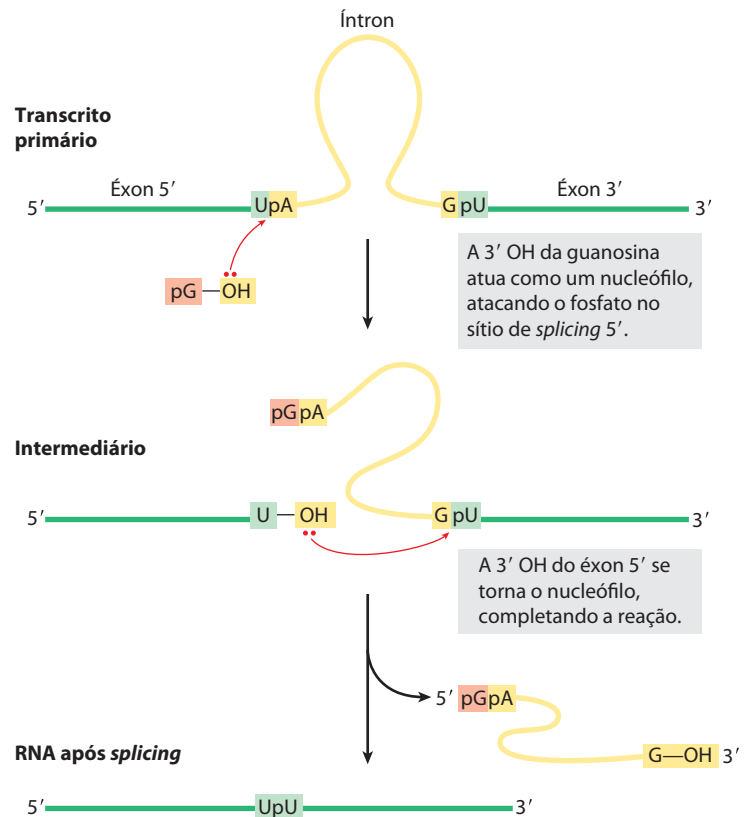



**FIGURA 26-14 Mecanismo de *splicing* de íntrons do grupo I.** O nucleófilo na primeira etapa pode ser a guanosina, GMP, GDP ou GTP. O íntron que sofre *splicing* acaba degradado.

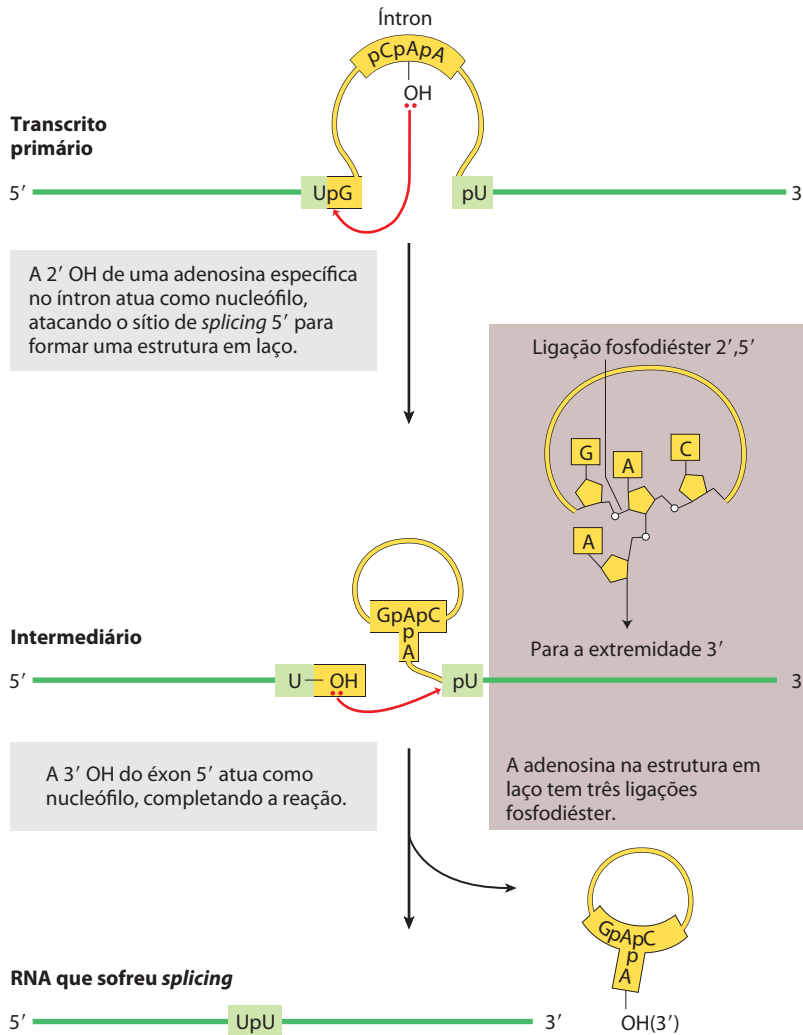



**FIGURA 26-15 O mecanismo de *splicing* dos íntrons do grupo II.** A química é semelhante àquela do *splicing* dos íntrons do grupo I, exceto pela identidade do nucleófilo na primeira etapa e formação de um intermediário em laço, em que um ramo é uma ligação fosfodiéster 2′,5′.

classe de RNA eucarionte, de 100 a 200 nucleotídeos de comprimento, conhecida como **RNAs nucleares pequenos** (**snRNA**). Cinco snRNA (U1, U2, U4, U5 e U6) envolvidos nas reações de *splicing* são geralmente encontrados em abundância nos núcleos de eucariontes. Os RNA e as proteínas nos snRNP são altamente conservados em eucariontes, de leveduras a humanos. ***Splicing* do mRNA**

Os íntrons do *spliceossomo* geralmente têm a sequência de dinucleotídeos GU na extremidade 5′ e AG na extremidade 3′, e essas sequências marcam os sítios em que o *splicing* ocorre. O snRNA U1 contém uma sequência complementar às sequências próximas do sítio de *splice* 5′ dos íntrons do mRNA nuclear (**Figura 26-16a**), e snRNP U1 se liga à essa região no transcrito primário. A adição dos snRNP U2, U4, U5 e U6 leva à formação do *spliceossomo* (Figura 26-16b). Os snRNP juntos contribuem com cinco RNA e cerca de 50 proteínas para o núcleo do *spliceossomo*, uma reunião supramolecular quase tão complexa quanto o ribossomo (descrita no Capítulo 27). Talvez 50 proteínas adicionais sejam associadas ao *spliceossomo* em diferentes estágios no processo de *splicing*, com algumas dessas proteínas tendo múltiplas funções: no *splicing*, transporte de mRNA para o citoplasma, tradução e na degradação final do mRNA. O ATP é necessário para a montagem do *spliceossomo*, mas as reações de clivagem-ligação do RNA não parecem precisar de ATP. Alguns íntrons de mRNA sofrem *splicing* por um tipo menos comum de *spliceossomo*, no qual os snRNP U1 e U2 são substituídos pelos snRNP U11 e U12. Enquanto os *spliceossomos* contendo U1 e U2 removem íntrons com sequências terminais (5′)GU e AG(3′), como mostrado na Figura 26-16, os *spliceossomos* que contêm U11 e U12 removem um tipo raro de íntrons que têm sequências terminais (5′)AU e AC(3′) para marcar os sítios de *splice* nos íntrons. Os *spliceossomos* usados no *splicing* do RNA nuclear podem ter evoluído de íntrons de grupo II mais antigos, com os snRNP substituindo os domínios catalíticos dos seus ancestrais que sofrem *autosplicing*.

Alguns dos componentes do aparato de *splicing* estão presos ao CTD da RNA-polimerase II, indicando que o *splicing*, como outras reações de processamento de RNA, é fortemente coordenado com a transcrição (Figura 26-16c). Assim que a primeira junção *splice* é sintetizada, ela é ligada por um *spliceossomo* preso. A segunda junção *splice* é então capturada por esse complexo à medida que ela passa, facilitando a justaposição das extremidades do íntron e o processo de *splicing* subsequente. Após o *splicing*, o íntron permanece no núcleo e é depois degradado.

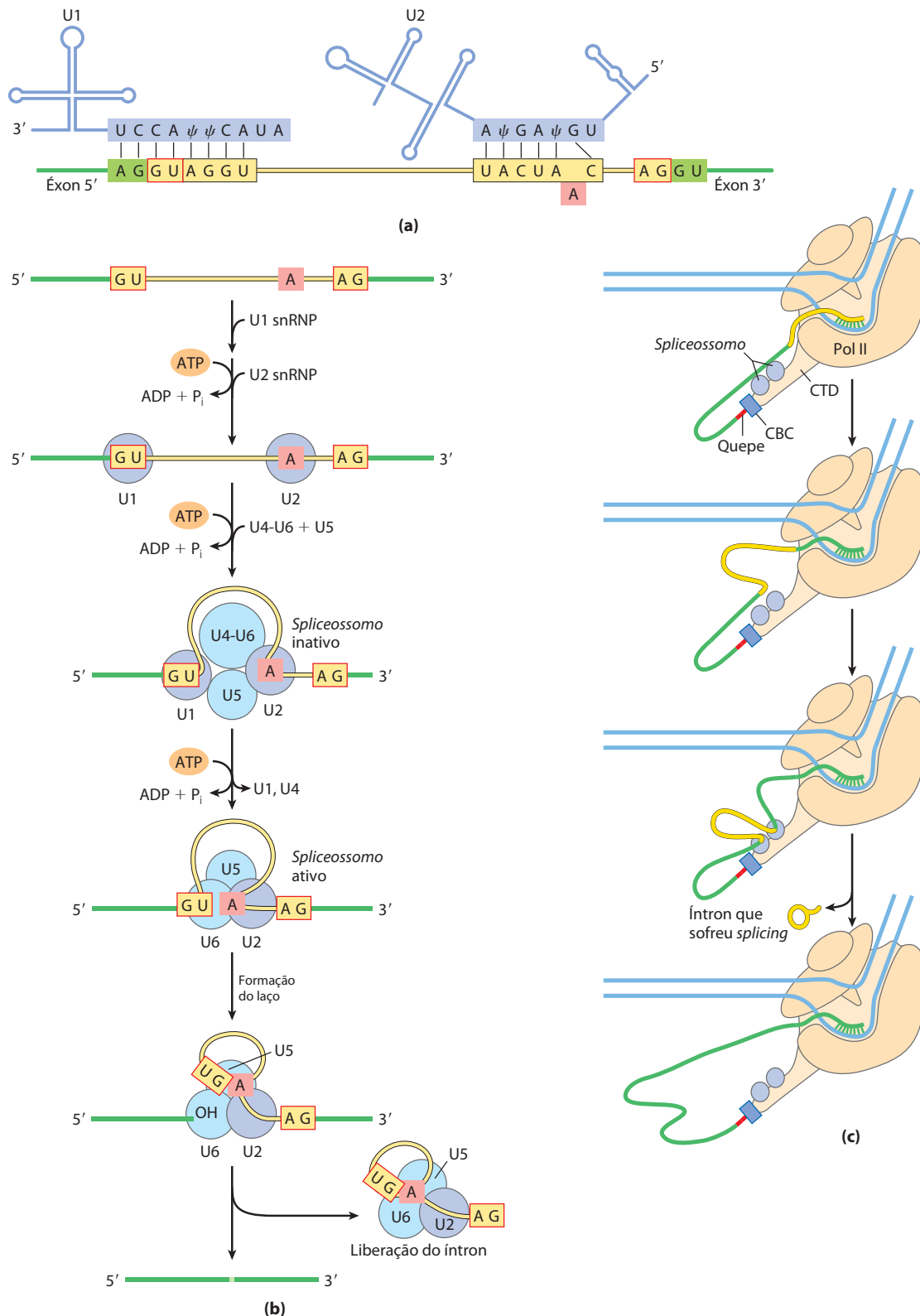



**FIGURA 26-16** **Mecanismo de *splicing* nos transcritos do mRNA primário. (a)** Interações de pareamento do RNA na montagem dos complexos de *spliceossomos*. O snRNA U1 tem uma sequência próxima de sua extremidade 5′ que é complementar ao sítio de *splicing* na extremidade 5′ do íntron. O pareamento de bases do U1 com essa região ajuda a definir o sítio de *splicing* 5′ durante a formação do *spliceossomo* (ψ é a pseudouridina; ver Figura 26-22). O U2 é pareado ao íntron em uma posição que envolve o resíduo A (sombreado em cor salmão) que se torna o nucleófilo durante a reação de *splicing*. O pareamento de bases do snRNA U2 provoca a formação de uma protuberância que desloca e ajuda a ativar o adenilato, cuja 2′ OH formará a estrutura em laço por meio de ligação fosfodiéster 2′,5′.

**(b)** Montagem dos *spliceossomos*. Os snRNP U1 e U2 se ligam, então os snRNP restantes (complexo U4-U6 e U5) se ligam para formar um *spliceossomo* inativo. Os rearranjos internos convertem essa espécie em um *spliceossomo* ativo no qual U1 e U4 foram expulsos e U6 está pareado tanto com o sítio de *splicing* 5′ quanto com U2. Em seguida ocorrem as etapas catalíticas, que são semelhantes àquelas do *splicing* dos íntrons do grupo II (ver Figura 26-15).

**(c)** A coordenação do *splicing* e a transcrição fazem os dois sites de *splicing* ficarem juntos. Mais detalhes no texto. O *spliceossomo* é muito maior do que indicado aqui.

A quarta classe de íntrons, encontrada em certos tRNA, se distingue dos íntrons dos grupos I e II pelo fato da reação de *splicing* precisar de ATP e de uma endonuclease. A endonuclease de *splicing* cliva as ligações fosfodiéster em ambas as extremidades do íntron, e os dois éxons são ligados por um mecanismo semelhante à reação da DNA-ligase (ver Figura 25-16).

Embora os íntrons do *spliceossomo* pareçam ser limitados a eucariontes, as outras classes de íntrons não o são. Genes com íntrons dos grupos I e II foram agora encontrados tanto em bactérias quanto em vírus bacterianos. O bacteriófago T4, por exemplo, tem vários genes codificadores de proteínas com íntrons do grupo I. Os íntrons podem ser mais comuns em arqueobactérias do que em bactérias.

## Os mRNA de eucariontes tem uma estrutura da extremidade 3′ característica

Na sua extremidade 3′, a maioria dos mRNAs eucarióticos tem um filamento de 80 a 250 resíduos A, que perfazem a **cauda poli(A)**. Essa cauda serve como um sítio de ligação para uma ou mais proteínas específicas. A cauda poli(A) e suas proteínas associadas provavelmente ajudam a proteger o mRNA de destruição enzimática. Muitos mRNAs bacterianos também adquirem caudas poli(A), mas essas caudas estimulam a destruição do mRNA em vez de protegê-lo da degradação.

A cauda de poli(A) é adicionada em um processo de várias etapas. O transcrito se estende além do local em que a cauda de poli(A) deve ser adicionada, é clivado no local de adição da poli(A) por um componente de endonuclease de um grande complexo enzimático, novamente associado ao CTD da RNA-polimerase II (**Figura 26-17**). O local do mRNA em que a clivagem ocorre é marcado por dois elementos de sequência: a sequência altamente conservada (5′)AAUAAA(3′), de 10 a 30 nucleotídeos no lado 5′ (a montante) do sítio de clivagem, e uma sequência menos bem definida rica em resíduos de G e U, de 20 a 40 nucleotídeos abaixo do local da clivagem. A clivagem gera o grupo livre 3′-hidroxila que define a extremidade do mRNA, à qual os resíduos A são imediatamente adicionados pela **polimerase poliadenilada**, que catalisa a reação

$$\text{RNA} + n\text{ATP} \longrightarrow \text{RNA} - (\text{AMP})_n + n\text{PP}_i$$

em que $n = 80$ a 250. Essa enzima não precisa de um molde mas exige o mRNA clivado como um iniciador.

O processamento geral de um típico mRNA eucarionte é resumido na **Figura 26-18**. Em alguns casos a região codificadora de polipeptídeos do mRNA também é modificada pela "editoração" do RNA (mais detalhes na Seção 27.1). Essa editoração inclui processos que adicionam ou excluem bases nas regiões codificadoras dos transcritos primários ou que mudam a sequência (p. ex., pela desaminação enzimática de um resíduo C para criar um resíduo U). Um exemplo particularmente drástico ocorre em tripanossomas, que são protozoários parasitas: grandes regiões de um mRNA são sintetizadas sem qualquer uridilato, e os resíduos U são inseridos posteriormente por editoração do RNA.

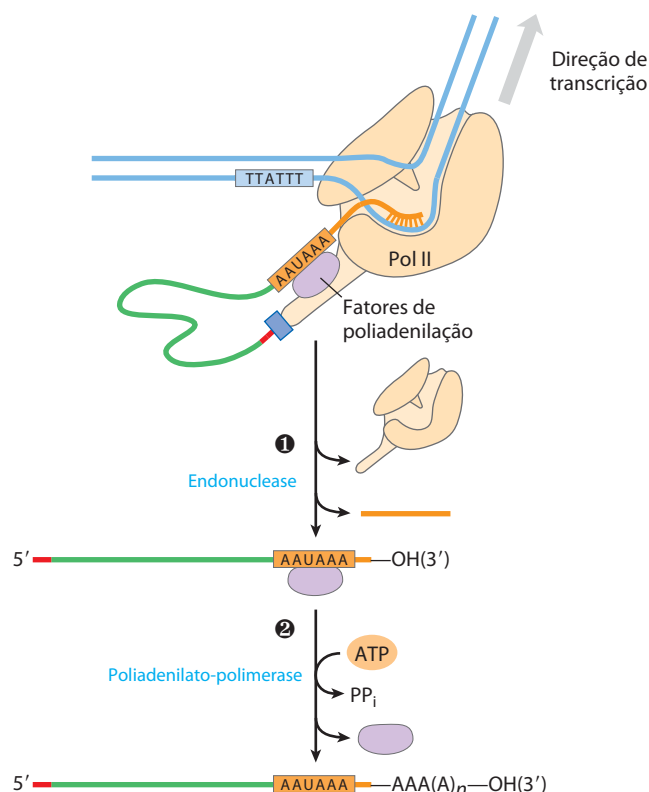



**FIGURA 26-17 Adição da cauda de poli(A) ao transcrito do RNA primário de eucariontes.** A Pol II sintetiza RNA além do segmento do transcrito contendo as sequências de sinalização de clivagem, incluindo a altamente conservada sequência a montante (5′)AAUAAA. Essa sequência de sinalização de clivagem está ligada por um complexo enzimático que inclui uma endonuclease, uma poliadenilato-polimerase, e várias outras proteínas multisubunidades envolvidas no reconhecimento de sequências, estimulação da clivagem e regulação do comprimento da cauda de poli(A), todos ligados ao CTD. ❶ O RNA é clivado pela endonuclease em um ponto 10 a 30 nucleotídeos 3′ (para baixo) da sequência AAUAAA. ❷ A poliadenilato-polimerase sintetiza uma cauda poli(A) de 80 a 250 nucleotídeos de comprimento, começando no sítio de clivagem.

## Um gene pode dar origem a múltiplos produtos por meio do processamento diferencial do RNA

Um dos paradoxos da genômica moderna é que a complexidade aparente dos organismos não se correlaciona com o número de genes codificadores de proteínas ou mesmo com a quantidade de DNA genômico. Entretanto, o foco tradicional em genes codificadores de proteínas ignora a complexidade do transcriptoma de um organismo. À medida que as funções do RNA são melhor compreendidas, novas complexidades genômicas se tornam aparentes.

Alguns transcritos de mRNA de eucariontes produzem apenas um mRNA maduro e um polipeptídeo correspondente, mas outros podem ser processados de mais de uma maneira para produzir *diferentes* mRNAs e, portanto, diferentes polipeptídeos. O transcrito primário contém sinais moleculares para todas as vias de processamento alternativo e a via favorecida em uma célula é determinada por fatores de processamento, proteínas ligadoras de RNA que promovem uma via particular.

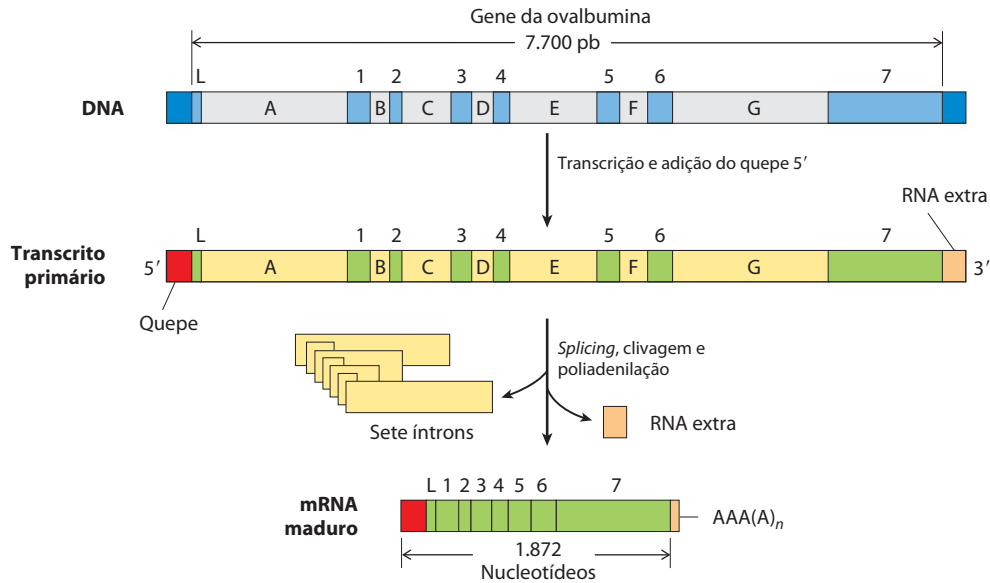



**FIGURA 26-18 Visão geral do processamento de um mRNA eucarionte.** O gene da ovalbumina, mostrado aqui, tem íntrons A a G e éxons 1 a 7 e L (o L codifica uma sequência de peptídeo sinalizador que tem como alvo a proteína de exportação da célula; ver Figura 27-38). Cerca de três quartos do RNA são removidos durante o processamento. A Pol II estende o transcrito primário bem além da clivagem e do sítio de poliadenilação ("RNA extra") antes de terminar a transcrição. Os sinais de terminação para a Pol II ainda não foram definidos.

Transcritos complexos podem ter ou mais de um sítio de clivagem e poliadenilação ou padrões de *splicing* alternativos, ou ambos. Se há dois ou mais sítios de clivagem e poliadenilação, o uso daquele mais próximo da extremidade de 5′ irá remover mais da sequência do transcrito primário (**Figura 26-19a**). Esse mecanismo, chamado de escolha do sítio de poli(A), produz diversidade nos domínios variáveis das cadeias pesadas da imunoglobulina (ver Figura 25-42). Padrões de *splicing* alternativos (Figura 26-19b) produzem, a partir de um transcrito primário comum, três formas diferentes da cadeia pesada da miosina em diferentes estágios do desenvolvimento da mosca-da-fruta. *Os dois*

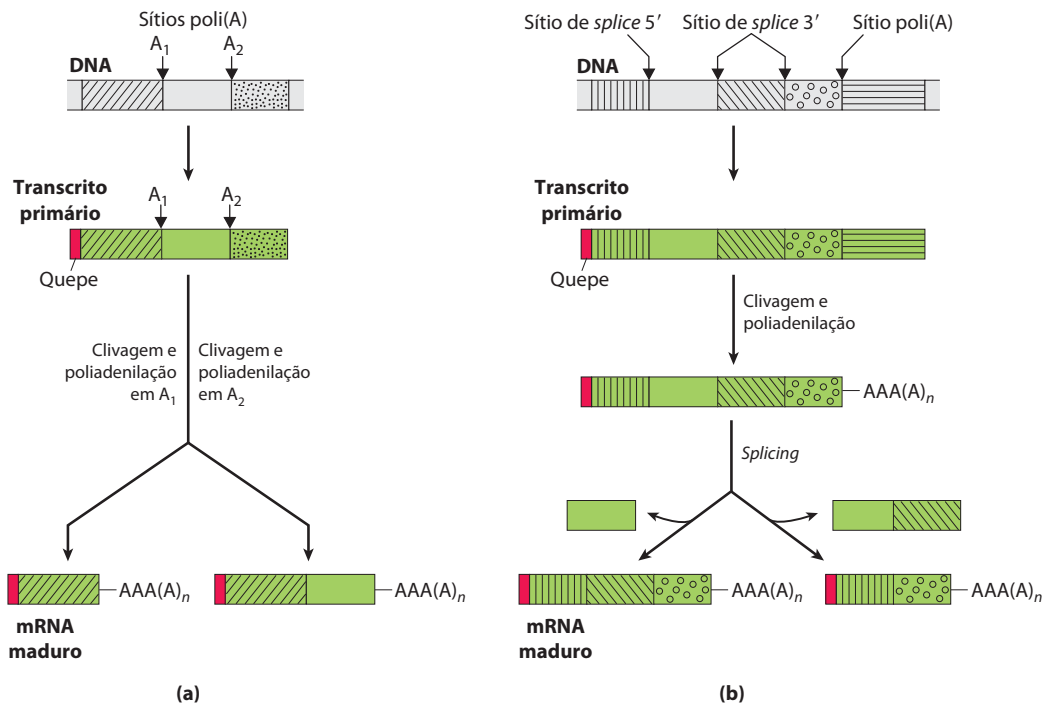



**FIGURA 26-19 Dois mecanismos para o processamento alternativo dos transcritos complexos em eucariontes. (a)** Padrões de clivagem alternativa e poliadenilação. Dois sítios poli(A), $A_1$ e $A_2$, são mostrados. **(b)** Padrões de *splicing* alternativo. Dois sítios 3′ diferentes de *splicing* são mostrados. Em ambos os mecanismos, mRNA maduros diferentes são produzidos a partir do mesmo transcrito primário.

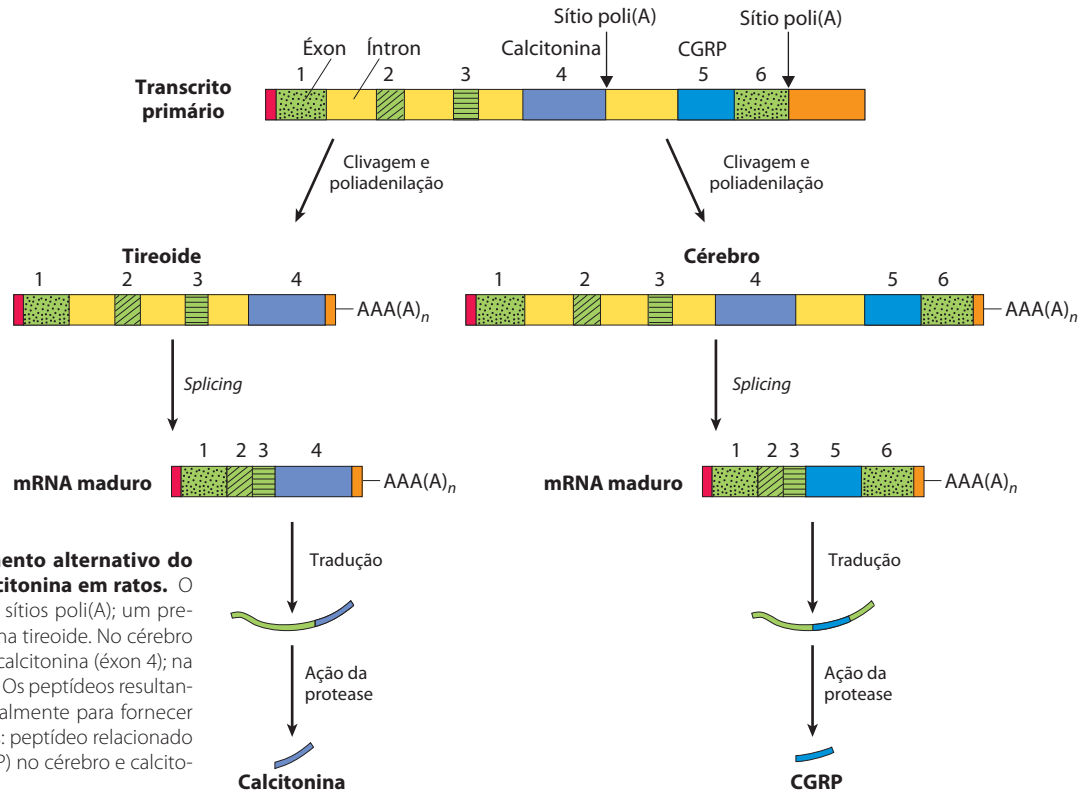



**FIGURA 26-20 Processamento alternativo do transcrito do gene da calcitonina em ratos.** O transcrito primário tem dois sítios poli(A); um predomina no cérebro, o outro na tireoide. No cérebro o *splicing* elimina o éxon da calcitonina (éxon 4); na tireoide este éxon é mantido. Os peptídeos resultantes são processados adicionalmente para fornecer os produtos hormonais finais: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) no cérebro e calcitonina na tireoide.

mecanismos ocorrem quando um único transcrito de RNA é processado de modo diferente para produzir dois hormônios diferentes: o hormônio regulador de cálcio calcitonina na tireoide de ratos e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) no cérebro do rato (**Figura 26-20**). Há vários padrões adicionais de *splicing* alternativo (**Figura 26-21**). Muitos, talvez a maioria, dos genes nos genomas de mamíferos estão sujeitos a *splicing* alternativo, aumentando substancialmente o número de proteínas codificadas pelos genes. Os mesmos processos desempenham um papel bem menor nos eucariontes inferiores, com apenas alguns poucos genes sujeitos a *splicing* alternativo nas leveduras.

## RNA ribossomais e tRNAs também sofrem processamento

O processamento pós-transcricional não é limitado ao mRNA. Os RNAs ribossomais de bactérias, arqueobactérias e células eucariontes são feitos de precursores maiores chamados de **RNAs pré-ribossomais**, ou pré-rRNAs. Os RNAs transportadores são do mesmo modo derivados de precursores maiores. Estes RNAs também podem conter vários nucleosídeos modificados; alguns exemplos sendo mostrados na **Figura 26-22**.

**RNAs ribossomais** Em bactérias, rRNAs 16S, 23S e 5S (e alguns tRNAs, embora a maioria deles seja codificada em

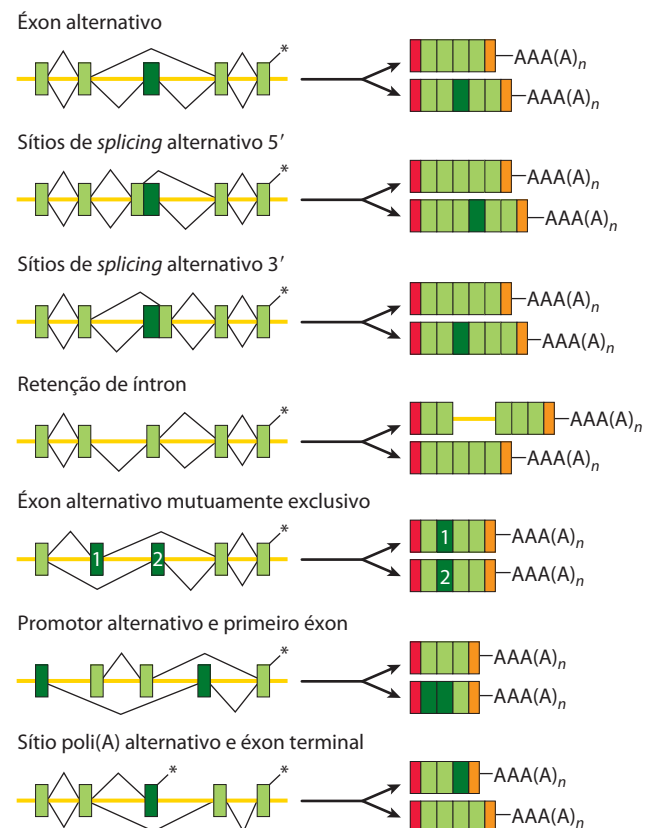



**FIGURA 26-21 Resumo dos padrões de *splicing*.** Os éxons são mostrados em tons de verde, e íntrons/regiões não traduzidas como linhas amarelas. Posições em que a poliadenosina será adicionada são marcadas com asteriscos. Os éxons ligados em um esquema de *splicing* particular são ligados com linhas pretas. Os padrões alternativos de ligação acima e abaixo do transcrito levam a produtos de mRNA resultantes de *splicing* superiores e inferiores, respectivamente. Nos produtos, caixas vermelhas e alaranjadas representam as regiões de quepe 5′ e 3′ não traduzidas, respectivamente.

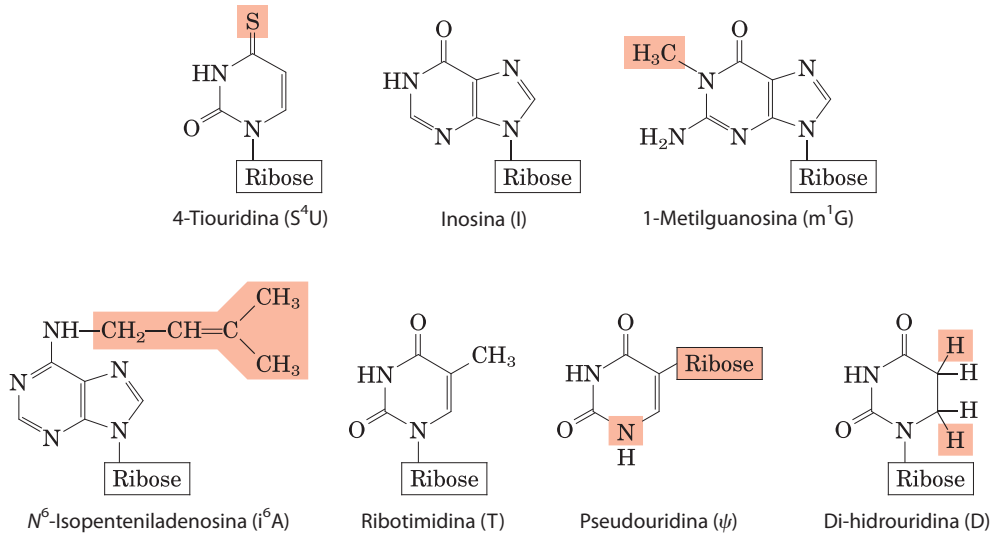



**FIGURA 26-22 Algumas bases modificadas de rRNA e tRNA, produzidas em reações pós-transcricionais.** Os símbolos padrão são mostrados entre parênteses. Observe o ponto de ligação incomum da ribose na pseudouridina. Isso é apenas uma pequena amostragem dos 96 nucleosídeos modificados que ocorrem em diferentes espécies de RNA, com 81 tipos diferentes conhecidos em tRNA e 30 observados até agora em rRNA. Uma lista completa dessas bases modificadas pode ser encontrada no banco de dados de modificação do RNA (http://rna-mdb.cas.albany.edu/RNAmods/).

outro lugar) surgem a partir de um único precursor de RNA 30S de cerca de 6.500 nucleotídeos. São removidos durante o processamento RNA de ambas as extremidades do precursor 30S e segmentos encontrados entre os rRNAs (**Figura 26-23**). Os rRNAs 16S e 23S contêm nucleosídeos modificados. Em *E. coli*, as 11 modificações no rRNA 16S incluem uma pseudopurina e 10 nucleosídeos metilados na base, no grupo 2′-hidroxila ou em ambos. O rRNA 23S tem 10 pseudopurinas, 1 di-hidrouridina e 12 nucleosídeos metilados. Em bactérias, cada modificação é geralmente catalisada por uma enzima diferente. As reações de metilação usam a *S*-adenosilmetionina como cofator. Nenhum cofator é necessário para a formação de pseudouridina.

O genoma da *E. coli* codifica sete moléculas pré-rRNA. Todos esses genes são essencialmente regiões codificadoras idênticas de rRNA, mas diferem nos segmentos entre essas regiões. O segmento entre os genes de rRNA 16S e 23S geralmente codificam um ou dois tRNA, com diferentes tRNA produzidos a partir de diferentes transcritos de pré-rRNA. As sequências de codificação para tRNA também são encontradas no lado 3′ do rRNA 5S em alguns transcritos precursores.

A situação em eucariontes é mais complicada. Um transcrito do pré-rRNA 45S é sintetizado pela RNA-polimerase I e processado no nucléolo para formar os rRNA 18S, 28S e 5,8S característicos dos ribossomos de euca-

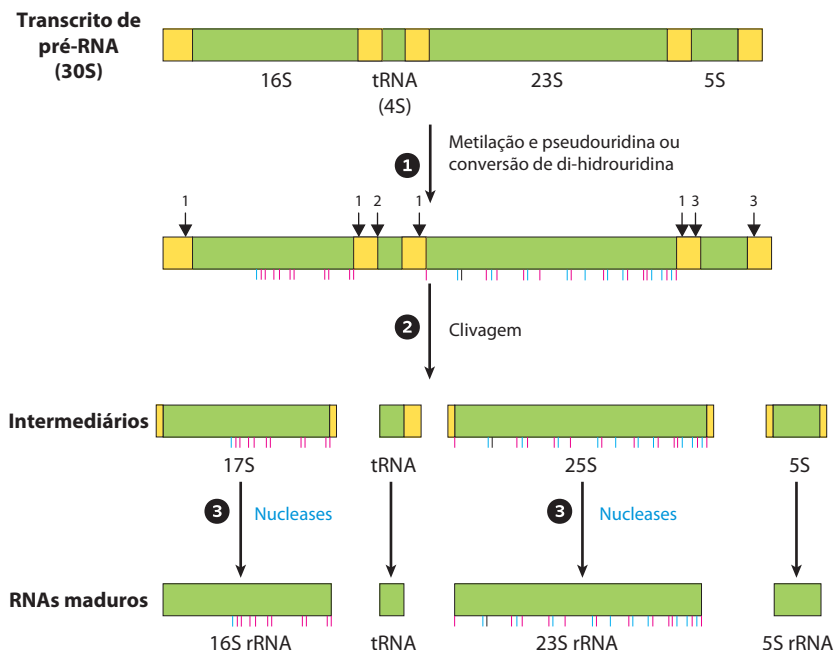



**FIGURA 26-23 Processamento dos transcritos de pré-rRNA em bactérias.** ❶ Antes da clivagem, o precursor do RNA 30S é metilado em bases específicas (marcas de escala cor-de-rosa) e alguns resíduos de uridina são convertidos em pseudouridina (marcas de escala azuis) ou resíduos de di-hidrouridina (marcas de escala pretas). As reações de metilação são de múltiplos tipos, alguns ocorrendo em bases e alguns em grupos 2′-hidroxila. ❷ A clivagem libera precursores de rRNAs e tRNAs. A clivagem nos pontos marcados 1, 2 e 3 é realizada pelas enzimas RNase III, RNase P, e RNase E, respectivamente. Como discutido posteriormente no texto, a RNase P é uma ribozima. ❸ Os produtos finais rRNA 16S, rRNA 23S e rRNA 5S resultam da ação de uma variedade de nucleases específicas. As sete cópias do gene para o pré-rRNA no cromossomo da *E. coli* diferem em número, localização e identidade dos tRNAs incluídos no transcrito primário. Algumas cópias do gene têm segmentos de genes de tRNAs adicionais entre os segmentos de rRNA 16S e 23S e na extremidade 3′ do transcrito primário.

riontes (**Figura 26-24**). Como nas bactérias, o processamento inclui reações de clivagem mediadas por endo ou exorribonucleases e reações de modificação de nucleosídeos. Alguns pré-RNAs também incluem íntrons que devem sofrer *splicing*. Todo o processo é iniciado no nucléolo, em grandes complexos que se reúnem no precursor de rRNA à medida que ele é sintetizado pela Pol I. Há uma forte ligação entre a transcrição de rRNA, maturação de rRNA e montagem do ribossomo no nucléolo. Cada complexo inclui as ribonucleases que clivam o precursor de rRNA, as enzimas que clivam bases específicas e grande número de **RNA nucleolares pequenos**, ou **snoRNA**, que guiam a modificação de nucleosídeos e algumas reações de clivagem, e proteínas ribossomais. Em leveduras, todo o processo envolve o pré-rRNA, mais de 170 proteínas não ribossomais, um conjunto de snoRNA para cada modificação de nucleosídeos (cerca de 70 no total, uma vez que alguns snoRNAs guiam dois tipos de modificações) e as 78 proteínas ribossomais. Os seres humanos têm um número ainda maior de nucleosídeos modificados, cerca de 200, e um número maior de snoRNA associados. A composição dos complexos pode mudar à medida que os ribossomos são montados e vários dos complexos intermediários podem competir em complexidade com o próprio ribossomo e as snRNPs. O rRNA 5S da maioria dos eucariontes é produzido como um transcrito inteiramente separado por uma polimerase diferente (Pol III).

**FIGURA 26-24 Processamento dos transcritos de pré-rRNA em vertebrados.** Durante a transcrição, o transcrito primário 45S é incorporado em um complexo pré-ribossomal 90S nucleolar, em que o processamento do rRNA e a montagem do ribossomo são fortemente associados. ❶ O precursor 45S é metilado em mais de 100 dos seus 14.000 nucleotídeos, ou nas bases ou nos grupos 2′-OH (marcas cor-de-rosa), algumas uridinas são convertidas em pseudouridinas (marcas azuis) e algumas poucas outras modificações ocorrem (marcas verdes são di-hidrouridinas). ❷ e ❸ Uma série de clivagens enzimáticas do precursor 45S produz os rRNA 18S, 5,8S e 28S, e as subunidades ribossomais gradualmente ganham forma com a montagem das proteínas ribossomais. As reações de clivagem e todas as modificações precisam de pequenos RNA nucleolares (snoRNA) encontrados em complexos proteicos (snoRNP) no nucléolo que lembram os *spliceossomos*. O rRNA 5S é produzido separadamente.

As modificações de nucleosídeos mais comuns nos rRNAs de eucariontes são, mais uma vez, a conversão de uridina em pseudouridina e metilação de nucleosídeos dependente de adoMet (frequentemente em grupos 2′-hidroxila). Essas reações dependem de complexos de proteínas snoRNA, ou **snoRNP**, cada um consistindo em um snoRNA e quatro ou cinco proteínas, que inclui a enzima que provoca a modificação. Há duas classes de proteínas snoRNPs, ambas definidas pelos elementos de sequência chave conservados denominados por caixas com letras. As snoRNPs da caixa H/ACA estão envolvidas na pseudouridililação, e as snoRNPs da caixa C/D funcionam nas metilações 2′-*O*. Ao contrário da situação em bactérias, a mesma enzima pode participar de modificações em vários locais, guiadas pelos snoRNAs.

Os snoRNAs têm de 60 a 300 nucleotídeos de comprimento. Muitos são codificados no interior dos íntrons e de outros genes e cotranscritos com aqueles genes. Cada snoRNA inclui uma sequência de 10 a 21 nucleotídeos que é perfeitamente complementar a algum local em um rRNA. Os elementos da sequência conservada no resto do snoRNA se dobra em estruturas que são ligadas pelas proteínas snoRNP (**Figura 26-25**).

**RNAs transportadores** A maioria das células tem de 40 a 50 tRNAs diferentes, e as células eucariontes têm múltiplas cópias de vários genes de tRNA. Os RNAs transportadores são derivados de precursores de RNA mais longos pela remoção enzimática de nucleotídeos das extremidades 5′e 3′ (**Figura 26-26**). Em eucariontes, os íntrons estão presentes em poucos transcritos de tRNA e devem ser retirados. Quando dois ou mais tRNAs diferentes estão contidos em um único transcrito primário, eles são separados por clivagem enzimática. A endonuclease RNase P, encontrada em todos os organismos, remove o RNA na extremidade 5′ dos tRNAs. Essa enzima contém tanto proteína quanto RNA. O componente de RNA é essencial para sua atividade e em células bacterianas ele pode desempenhar sua função de processamento com precisão mesmo sem o componente proteico. A RNase P é, portanto, outro exemplo de um RNA catalítico, como descrito com mais detalhe a seguir. A extremidade 3′ dos tRNAs é processada por uma ou mais nucleases, incluindo a exonuclease RNase D.

**FIGURA 26-25 Função dos snoRNAs em guiar a modificação do rRNA.** **(a)** Pareamento do RNA com os snoRNAs da caixa C/D para guiar as reações de metilação. Os sítios de metilação no rRNA-alvo (verde-escuro) estão nas regiões pareadas com o snoRNA C/D. As sequências caixa altamente conservadas C e D (e C9 e D9) são sítios de ligação para proteínas que compõem o maior snoRNP. **(b)** Pareamento do RNA com snoRNA da caixa H/ACA para guiar pseudouridililações. Os sítios de conversão da pseudouridina no rRNA-alvo (segmentos verdes) estão novamente nas regiões pareadas com o snoRNA, e as sequências da caixa H/ACA conservada são sítios de ligação de proteínas.

Os precursores do RNA transportador podem sofrer processamento pós-transcricional adicional. O trinucleotídeo CCA(3′) 3′-terminal, ao qual um aminoácido é ligado durante a síntese proteica (Capítulo 27), está ausente de alguns precursores de tRNAs bacterianos e de todos os de eucariontes e é adicionado durante o processamento (Figura 26-26). Essa adição é feita pela nucleotidiltransferase do tRNA, enzima incomum que liga os três precursores de ribonucleosídeos trifosfato em sítios ativos separados e catalisa a formação de ligações fosfodiéster para produzir a sequência CCA(3′). A criação dessa sequência definida de nucleotídeos é, portanto, não dependente de um molde de DNA ou RNA – o molde é o sítio de ligação da enzima.

O tipo final de processamento de tRNA é a modificação de algumas bases por metilação, desaminação ou redução (Figura 26-22). No caso da pseudouridina, a base (uracila) é removida e religada ao açúcar por meio do C-5. Algumas dessas bases modificadas ocorrem em posições características em todos os tRNAs (Figura 26-26).

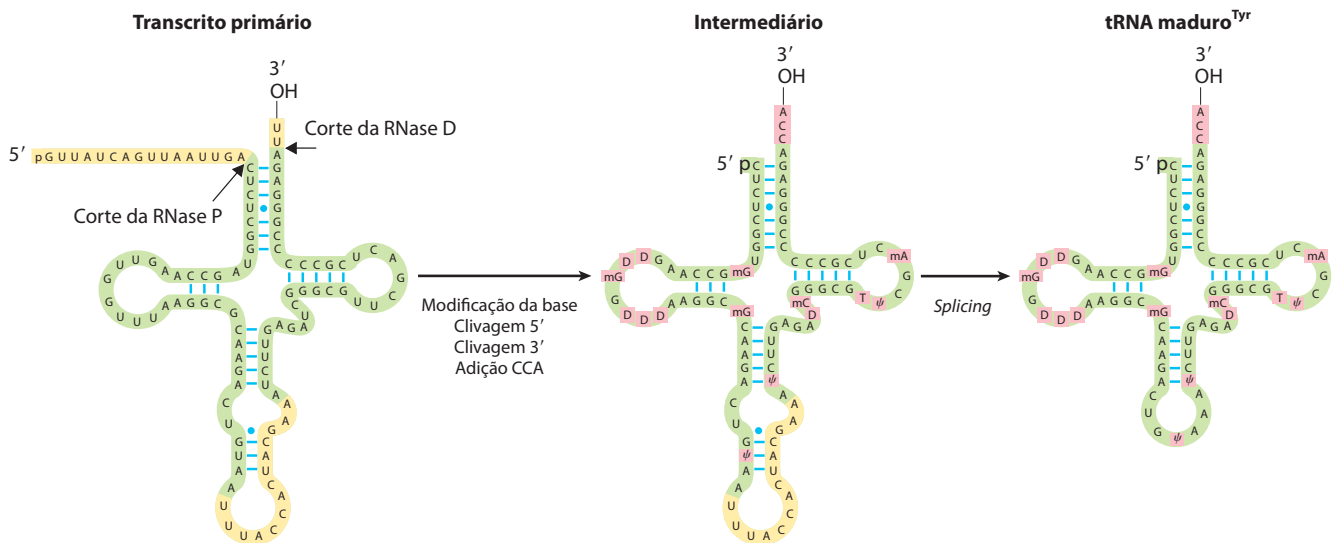



**FIGURA 26-26 Processamentos dos tRNAs em bactérias e eucariontes.** O tRNA$^{Tyr}$ (o tRNA específico para a ligação da tirosina; ver Capítulo 27) é usado para ilustrar as etapas importantes. As sequências de nucleotídeos mostradas em amarelo são removidas do transcrito primário. As extremidades são processadas primeiro, a extremidade 5′ antes da extremidade 3′. O CCA é então adicionado à extremidade 3′, etapa necessária no processamento dos tRNAs de eucariontes e daqueles tRNAs bacterianos que não apresentam essa sequência no transcrito primário. Enquanto as extremidades estão sendo processadas, bases específicas no resto do transcrito são modificadas (ver Figura 26-22). Para o tRNA de eucariontes mostrado aqui, a etapa final é o *splicing* do íntron de 14 nucleotídeos. Os íntrons são encontrados em alguns tRNAs de eucariontes mas não em tRNAs bacterianos.

## Os RNAs com função especial sofrem vários tipos de processamento

O número de classes conhecidas de RNAs de função especial está aumentando rapidamente, bem como a variedade de funções associadas a eles. Muitos desses RNAs sofrem processamento.

Os snRNAs e snoRNAs não apenas facilitam as reações de processamento do RNA mas são eles mesmos sintetizados como precursores maiores, e então processados. Muitos snoRNAs são codificados no interior dos íntrons de outros genes. À medida que os íntrons sofrem *splicing* a partir do pré-mRNA, as proteínas snoRNPs se ligam às sequências de snoRNA e as ribonucleases removem o RNA extra nas extremidades 5′e 3′.

Os snRNAs destinados aos *spliceossomos* são sintetizados como pré-snRNA pela RNA-polimerase II, e as ribonucleases removem o RNA extra em cada extremidade. Nucleosídeos particulares nos snRNAs também são sujeitos a 11 tipos de modificação, com o predomínio da 2′-*O*-metilação e conversão de uridina em pseudouridina.

Os **microRNAs** (**miRNAs**) são uma classe especial de RNAs envolvidos na regulação gênica. São RNAs não codificadores, com cerca de 22 nucleotídeos de comprimento, complementares das sequências de regiões particulares de mRNAs. Eles regulam o funcionamento do mRNA pela sua clivagem ou impedindo a sua tradução. Os miRNAs são encontrados em eucariontes multicelulares que variam de vermes e moscas-da-fruta a plantas e mamíferos. Até 1% do genoma humano pode codificar miRNA, e esses podem ter como alvo até um terço dos mRNAs humanos. Sua função na regulação gênica é descrita no Capítulo 28.

Os miRNAs são sintetizados a partir de precursores muito maiores, em várias etapas (**Figura 26-27**). Os transcritos primários para miRNA (pri-miRNA) variam muito de tamanho; alguns deles são codificados nos íntrons de outros genes e são coexpressados com esses genes hospedeiros. Seus papéis na regulação gênica também são detalhados no Capítulo 28.

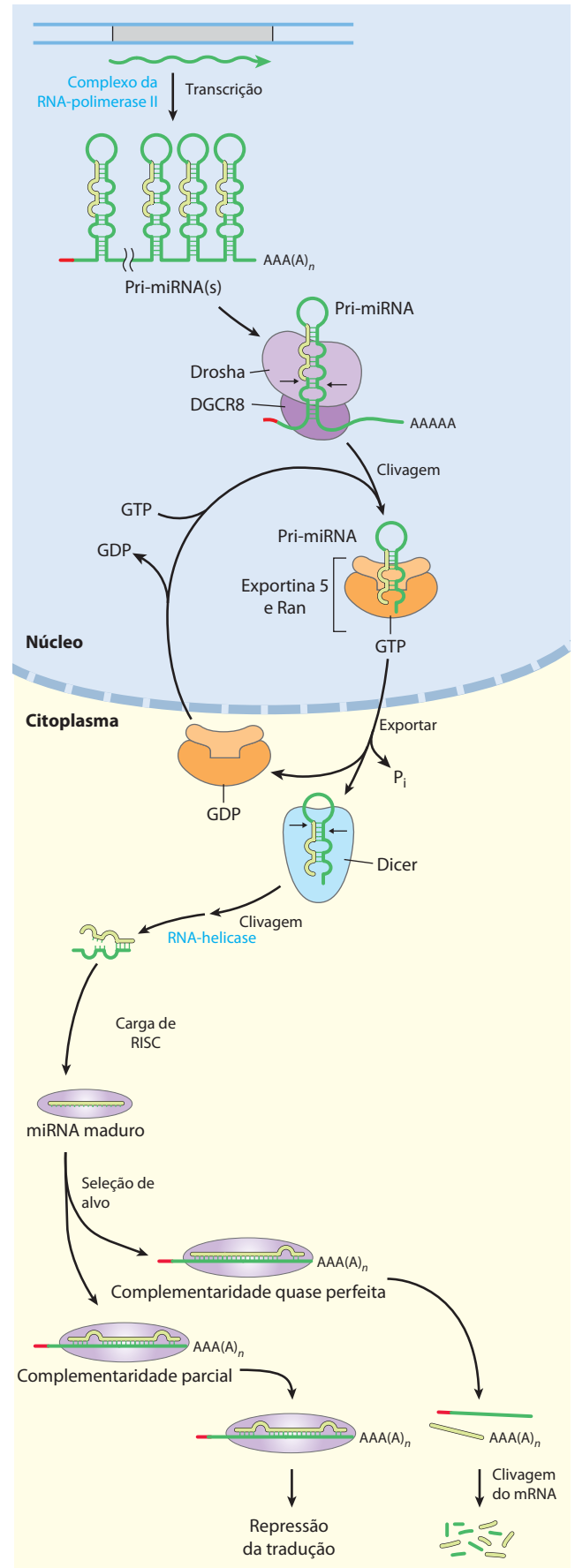



**FIGURA 26-27 Síntese e processamento dos miRNAs.** O transcrito primário dos miRNAs é um RNA maior de comprimento variável, um pri-miRNA. A maior parte do seu processamento é mediada por duas endorribonucleases na família da RNase III, Drosha e Dicer. Primeiro, no núcleo, o pri-miRNA é reduzido a um precursor miRNA de 70 a 80 nucleotídeos (pré-miRNA) por um complexo proteico que inclui a Drosha e outra proteína, a DGCR8. A pré-miRNA é então exportada para o citoplasma em um complexo com uma proteína chamada exportina-5 e a Ran GTPase (ver Figura 27-42). No citoplasma, a Ran hidrolisa o GTP e então a proteína exportina-5 e o pré-miRNA são liberados. As proteínas Ran-GDP e exportina 5 são transportadas de volta para o núcleo. O pré-miRNA é acionado pela Dicer para produzir o quase maduro miRNA pareado com um pequeno complemento de RNA. O complemento é removido por uma RNA-helicase, e o miRNA maduro é incorporado em complexos de proteínas, como o complexo de silenciamento induzido pelo RNA (RISC), que então se liga a um mRNA-alvo. Se a complementaridade entre o miRNA e seu alvo é quase que totalmente perfeita, o mRNA-alvo é clivado. Se a complementaridade é apenas parcial, o complexo bloqueia a tradução do mRNA-alvo.

## As enzimas de RNA são os catalisadores de alguns eventos no metabolismo de RNA

O estudo do processamento pós-transcricional de moléculas de RNA levou a uma das descobertas mais excitantes da bioquímica moderna – a existência de enzimas de RNA. As ribozimas melhor caracterizadas são os íntrons do grupo I que sofrem *autosplicing*, RNase P e a ribozima cabeça-de-martelo (discutida a seguir). A maior parte das atividades dessas ribozimas se baseia em duas reações fundamentais: transesterificação (Figura 26-13) e hidrólise da ligação fosfodiéster (clivagem). O substrato para as ribozimas é frequentemente uma molécula de RNA, e pode até mesmo ser parte da própria ribozima. Quando o seu substrato é o RNA, o catalisador de RNA pode fazer uso de interações de pares de bases para alinhar o substrato para a reação.

As ribozimas variam muito de tamanho. Um íntron do grupo I que sofre *autosplicing* pode ter mais de 400 nucleotídeos. A ribozima cabeça-de-martelo consiste em duas fitas de RNA com apenas 41 nucleotídeos no total (**Figura 26-28**). Como nas enzimas proteicas, a estrutura tridimensional das ribozimas é importante para seu funcionamento. As ribozimas são inativadas pelo calor acima da sua temperatura de fusão ou pela adição de agentes desnaturadores ou de oligonucleotídeos complementares, que quebram os padrões normais de pareamento de bases. As ribozimas também podem ser inativadas se nucleotídeos essenciais forem alterados. A estrutura secundária de um íntron do grupo I que sofre *autosplicing* a partir do precursor do rRNA 26S da *Tetrahymena* é mostrado em detalhe na **Figura 26-29**.

**Propriedades enzimáticas dos íntrons do grupo I** Os íntrons do grupo I que sofrem *autosplicing* compartilham várias propriedades com enzimas além de acelerar a taxa de reação, incluindo seu comportamento cinético e sua especificidade. A ligação do cofator da guanosina (Figura 26-13) ao íntron do grupo I do rRNA da *Tetrahymena* é saturável ($K_m \approx 30$ $\mu$M) e pode ser competitivamente inibida pela 3′-desoxiguanosina. O íntron é muito preciso na sua reação de excisão, em grande parte devido a um segmento chamado de **sequência-guia interna** que pode se parear com sequências de éxons próximas do sítio de *splice* 5′ (Figura 26-29). Esse pareamento promove o alinhamento de ligações específicas a serem clivadas e religadas.

Como o próprio íntron é quimicamente alterado durante a reação de *splicing* – suas extremidades são clivadas – ele parece não ter uma propriedade enzimática essencial: a capacidade de catalisar reações múltiplas. Observação mais detalhada demonstrou que após a excisão, o íntron de 414 nucleotídeos do rRNA da *Tetrahymena* pode, *in vitro*, atuar como uma verdadeira enzima (mas *in vivo* ele é rapidamente degradado). Uma série de ciclizações intramoleculares e reações de clivagem no íntron extirpado leva à perda de 19 nucleotídeos de sua extremidade 5′. Os 395 nucleotídeos restantes, um RNA linear – chamado de L-19 IVS (*sequência de intervenção*) – promove reações de transferência de nucleotidil em que alguns oligonucleotídeos são aumentados à custa de outros (**Figura 26-30**). Os melhores substratos são oligonucleotídeos, tais como um oligômero $(C)_5$ sintético, que pode se parear com a mesma sequência-guia interna rica em guanilato que manteve o éxon 5′ no lugar para *autosplicing*.

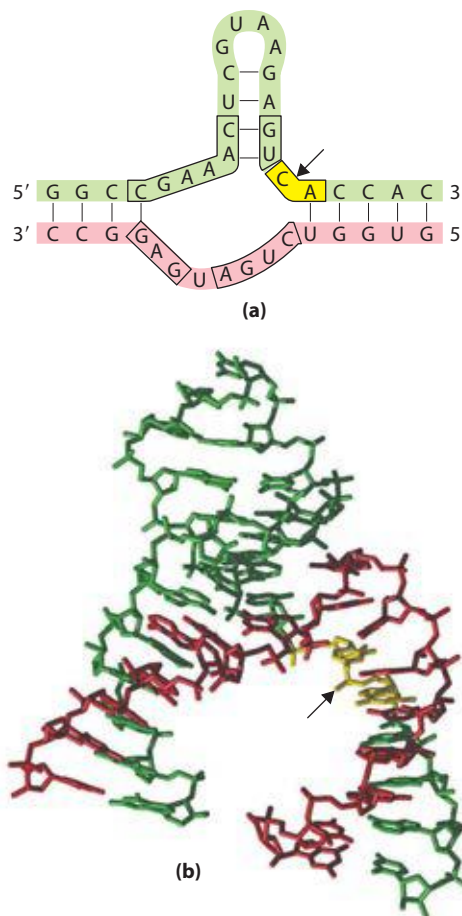



**FIGURA 26-28 Ribozima cabeça-de-martelo.** Certos elementos semelhantes a vírus, ou virusoides, têm pequenos genomas de RNA e geralmente precisam de outro vírus para auxiliar sua replicação ou acondicionamento, ou ambos. Alguns RNAs virusoides incluem pequenos segmentos que promovem reações de clivagem de RNAs específicas de sítios associadas à replicação. Esses segmentos são chamados de ribozimas cabeça-de-martelo, pois suas estruturas secundárias têm a forma da cabeça de um martelo. Essas ribozimas foram identificadas e estudadas separadamente a partir de RNAs virais bem maiores. **(a)** As sequências mínimas necessárias para catálise pela ribozima. Os nucleotídeos encaixotados são altamente conservados e são necessários para a função catalítica. A seta indica o sítio de autoclivagem. **(b)** Estrutura tridimensional (PDB ID 1MME; consultar na Figura 8-25b uma visão de volume atômico). As fitas são coloridas como em (a). A ribozima cabeça-de-martelo é uma metaloenzima; íons $Mg^{2+}$ são necessários para atividade *in vivo*. A ligação fosfodiéster no sítio de autoclivagem é indicada por uma seta. **Ribozima cabeça-de-martelo**

A atividade enzimática da ribozima L-19 IVS resulta de um ciclo de reações de transesterificação mecanicamente semelhantes ao *autosplicing*. Cada molécula de ribozima pode processar cerca de 100 moléculas de substrato por hora e não é alterada na reação; portanto, o íntron atua como um catalisador. Ele segue a cinética de Michaelis-Menten, é específico para os substratos de oligonucleo-

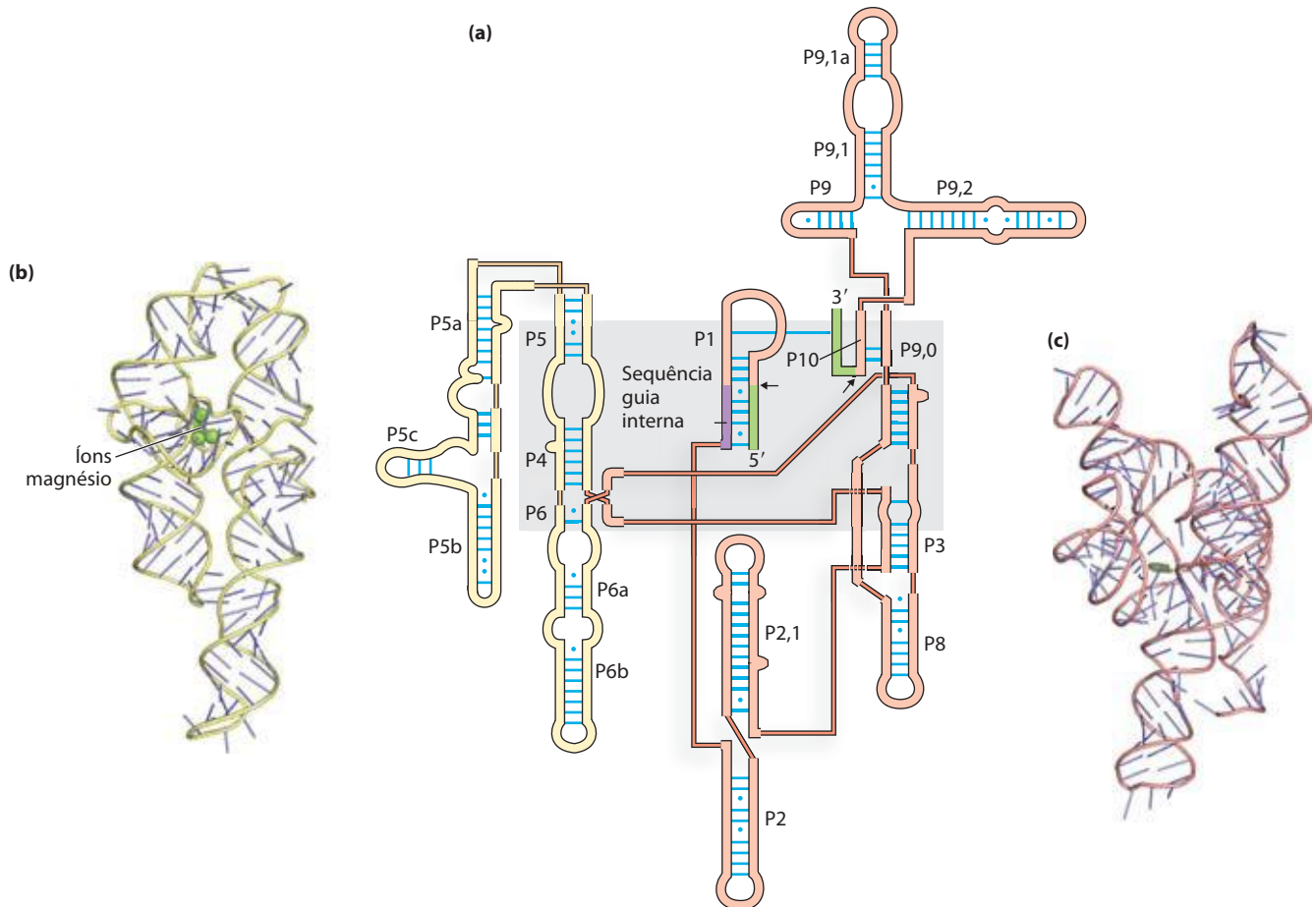



**FIGURA 26-29 Estrutura secundária do íntron de rRNA que sofre *autosplicing* de *Tetrahymena*. (a)** As sequências íntron são sombreadas de amarelo e cor salmão, sequências éxon em verde. Cada linha fina em cor salmão representa uma ligação entre nucleotídeos vizinhos em uma sequência contínua (dispositivo necessário ao mostrar essa molécula complexa em duas dimensões). Linhas azuis curtas representam pareamento normal de bases; pontos azuis indicam pares de bases G–U. Todos os nucleotídeos são mostrados. O núcleo catalítico da atividade de *autosplicing* é sombreado em cinza. Algumas regiões de pareamento de bases são marcadas (P1, P3, P2,1, P5a e assim por diante) de acordo com uma convenção estabelecida para essa molécula de RNA. A região P1, que contém a sequência-guia interna (roxo), é a localização do sítio de *splicing* 5′ (seta preta). Parte da sequência-guia interna pareia com a extremidade do éxon 3′, colocando os sítios de *splicing* 5′ e 3′ (setas pretas) em proximidade estreita. **(b)** (PDB ID 1GID) Estrutura tridimensional do domínio P4–P6, mostrada em amarelo em (a). **(c)** (PDB ID 1U6B) Estrutura tridimensional da maior parte do resto do íntron, mostrada em cor salmão em (a).

tídeos do RNA, e pode ser inibido competitivamente. A $k_{cat}/K_m$ (constante de especificidade) é de $10^3$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, mais baixa que aquela de várias enzimas, mas a ribozima acelera a hidrólise por um fator de $10^{10}$ em relação à reação não catalisada. Ela faz uso das estratégias de orientação do substrato, catálise covalente e catálise do íon metálico, todas empregadas pelas proteínas enzimáticas.

**Características de outras ribozimas** A RNase P da *E. coli* tem tanto um componente de RNA (o M1 RNA, com 377 nucleotídeos) quanto um componente proteico ($M_r$ 17.500). Em 1983, Sidney Altman e Norman Pace e seus colaboradores descobriram que sob determinadas condições o M1 RNA sozinho é capaz de catálise, clivando os precursores de tRNA na posição correta. O componente proteico aparentemente serve para estabilizar o RNA ou facilitar sua função *in vivo*. A ribozima RNase P reconhece a forma tridimensional do seu substrato pré-tRNA, junto com a sequência CCA, e, portanto, pode clivar os líderes 5′ de diversos tRNAs (Figura 26-26).

O repertório de ribozimas catalíticas conhecidas continua se expandir. Alguns virusoides, pequenos RNAs associados a vírus de RNA de plantas, incluem a estrutura que promove uma reação de autoclivagem; a ribozima cabeça-de-martelo ilustrada na Figura 26-28 está nessa classe, catalisando a hidrólise de uma ligação fosfodiéster interna. A reação de *splicing* que ocorre em um *spliceossomo* parece depender de um centro catalítico formado pelos snRNA U2, U5 e U6 (Figura 26-16). E, talvez mais importante, um componente RNA dos ribossomos catalisa a síntese de proteínas (Capítulo 27).

A investigação dos RNAs catalíticos forneceu novos entendimentos sobre a função catalítica em geral e tem importantes implicações para nossa compreensão sobre a origem e evolução da vida neste planeta, tópico discutido na Seção 26.3.

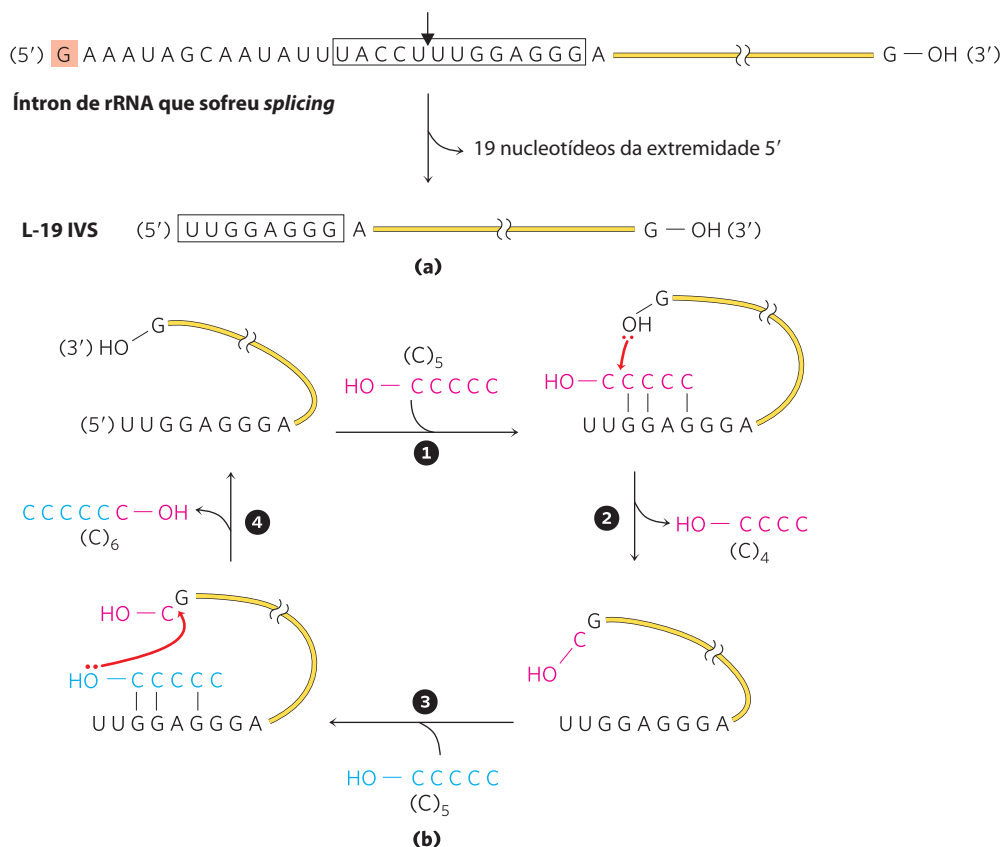



**FIGURA 26-30 Atividade catalítica *in vitro* da L-19 IVS. (a)** A L-19 IVS é gerada pela remoção autocatalítica de 19 nucleotídeos da extremidade 5′ do íntron de *Tetrahymena* que sofre *splicing*. O sítio de clivagem é indicado pela seta na sequência-guia interna (dentro da caixa). O resíduo G (sombreado de cor salmão) adicionado na primeira etapa da reação de *splicing* (ver Figura 26-14) é parte da sequência removida. Uma porção da sequência-guia interna permanece na extremidade 5′ do L-19 IVS. **(b)** A L-19 IVS alonga alguns oligonucleotídeos de RNA à custa de outros em um ciclo de reações de transesterificação (etapas ❶ a ❹). A 3′-OH do resíduo G na extremidade 3′ da L-19 IVS desempenha um importante papel neste ciclo (observe que este *não é* o resíduo G adicionado na reação de *splicing*). O $(C)_5$ é um dos melhores substratos da ribozima porque ele pode parear suas bases com a sequência-guia restante no íntron. Embora esta atividade catalítica seja provavelmente irrelevante para a célula, ela tem importantes aplicações para hipóteses atuais sobre evolução, discutidas ao final deste capítulo.

## Os mRNAs celulares são degradados em taxas diferentes

A expressão dos genes é regulada em vários níveis. Um fator crucial governando a expressão de um gene é a concentração celular do seu mRNA associado. A concentração de qualquer molécula depende de dois fatores: sua taxa de síntese e sua taxa de degradação. Quando a síntese e degradação de um mRNA estão equilibradas, a concentração do mRNA permanece em um estado estacionário. Uma mudança em qualquer das taxas resultará em uma acumulação ou esgotamento do mRNA. Vias de degradação garantem que os mRNAs não se acumulem na célula, dirigindo a síntese de proteínas desnecessárias.

As taxas de degradação variam muito para mRNAs nos diferentes genes de eucariontes. Para um produto de um gene que é necessário apenas temporariamente, a meia-vida do seu mRNA pode ser de apenas minutos ou mesmo segundos. Os produtos gênicos necessários constantemente pela célula podem ter mRNAs que são estáveis por várias gerações celulares. A meia-vida média dos mRNAs de uma célula de vertebrado é de cerca de 3 horas, com o conjunto de cada tipo de mRNA sendo reposto cerca de 10 vezes por geração celular. A meia-vida dos mRNAs bacterianos é muito menor –apenas cerca de 1,5 min – talvez devido às necessidades de regulação.

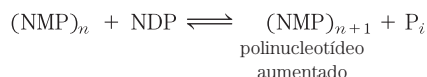
O RNA mensageiro é degradado pelas ribonucleases presentes em todas as células. Na *E. coli*, o processo começa com um ou vários cortes por uma endorribonuclease, seguido por degradação 3′→5′ por exorribonucleases. Em eucariontes inferiores, a via principal envolve primeiro o encurtamento da cauda poli(A), em seguida a remoção do quepe da extremidade 5′ e a degradação do mRNA na direção 5′→3′. Uma via degradativa 3′→5′ também existe e pode ser a via principal em eucariontes superiores. Todos os eucariontes têm um complexo de até 10 exorribonucleases conservadas 3′→5′, chamados de **exossomo**, que está envolvido no processamento da extremidade 3′ de rRNA, tRNA e alguns RNAs de função especial (incluindo snRNA e snoRNA), bem como a degradação de mRNAs.

Uma estrutura em grampo nos mRNAs bacterianos com um terminador independente de $\rho$ (Figura 26-7) confere estabilidade contra a degradação. Estruturas se-

melhantes a grampos podem tornar mais estáveis algumas partes de um transcrito primário, levando à degradação não uniforme dos transcritos. Em células de eucariontes, tanto a cauda poli(A) 3′ quanto o quepe 5′ são importantes para a estabilidade de vários mRNAs. **Ciclo de vida de um mRNA**

## A polinucleotídeo-fosforilase produz polímeros aleatórios semelhantes ao RNA

Em 1955, Marianne Grunberg-Manago e Severo Ochoa descobriram a enzima bacteriana **polinucleotídeo-fosforilase**, que catalisa *in vitro* a reação

$$(\text{NMP})_n + \text{NDP} \rightleftharpoons \underset{\substack{\text{polinucleotídeo} \\ \text{aumentado}}}{(\text{NMP})_{n+1}} + \text{P}_i$$

A polinucleotídeo-fosforilase foi a primeira enzima sintetizadora de ácidos nucleicos descoberta (a descoberta da DNA-polimerase por Arthur Kornberg ocorreu logo em seguida). A reação catalisada pela polinucleotídeo-fosforilase difere fundamentalmente das atividades da polimerase discutidas até agora pelo fato de não ser dependente de molde. A enzima usa 5′-difosfatos de ribonucleosídeos como substratos e não pode atuar nos homólogos 5′-trifosfatos ou nos desoxirribonucleosídeos 5′-difosfatos. O polímero de RNA formado pela polinucleotídeo-fosforilase contém as ligações usuais 3′,5′-fosfodiéster, que podem ser hidrolisadas pela ribonuclease. A reação é prontamente reversível e pode ser empurrada na direção da quebra do polirribonucleotídeo aumentando-se a concentração de fosfato. A provável função dessa enzima na célula é a degradação dos mRNAs a nucleosídeos difosfatos.

Marianne Grunberg-Manago, 1921–2013

Severo Ochoa, 1905–1993

Como a reação de polinucleotídeo-fosforilase não usa um molde, o polímero que ela forma não tem uma sequência de bases específica. A reação ocorre igualmente bem com qualquer um ou todos os quatro nucleosídeos difosfatos, e a composição de bases do polímero resultante reflete nada mais do que as concentrações relativas dos substratos 5′-difosfato no meio. A polinucleotídeo-fosforilase pode ser usada em laboratório para preparar polímeros de RNA com muitas sequências de base e frequências diferentes. Os polímeros de RNA desse tipo sintetizados foram cruciais para deduzir o código genético para os aminoácidos (Capítulo 27).

### RESUMO 26.2 Processamento de RNA

- Os mRNAs de eucariontes são modificados pela adição de um resíduo de 7-metilguanosina na extremidade 5′ e pela clivagem e poliadenilação na extremidade 3′ para formar uma longa cauda poli(A).
- Muitos transcritos primários de mRNA contêm íntrons (regiões não codificadoras), que são removidos por *splicing*. A remoção dos íntrons do grupo I encontrada em alguns rRNAs precisa de um cofator de guanosina. Alguns íntrons do grupo I e grupo II são capazes de *autosplicing*; nenhuma proteína enzimática é necessária. Os precursores do mRNA nuclear têm uma terceira classe de íntrons (a maior), que sofrem *splicing* com a ajuda de complexos de RNA-proteína chamados snRNP, reunidos em *spliceossomos*. Uma quarta classe de íntrons, encontrada em alguns tRNAs, consiste nos únicos íntrons que se conhece que sofrem *splicing* por proteínas enzimáticas.
- A função de muitos mRNAs de eucariontes é regulada por microRNAs (miRNAs). Os miRNAs são em si derivados de precursores maiores por meio de uma série de reações de processamento.
- Os RNAs ribossomais e transportadores são derivados de RNAs precursores maiores, aparados por nucleases. Algumas bases são modificadas enzimaticamente durante o processo de maturação. Algumas modificações de nucleosídeos são guiadas por snoRNAs, com complexos de proteínas chamados de snoRNPs.
- Os íntrons que sofrem *autosplicing* e o componente de RNA da RNase P (que cliva a extremidade 5′ dos precursores de tRNA) são dois exemplos de ribozimas. Esses catalisadores biológicos têm as propriedades de enzimas verdadeiras. Eles geralmente promovem a clivagem hidrolítica e transesterificação, usando o RNA como substrato. Combinações dessas reações podem ser promovidas pelo íntron do grupo I retirado do rRNA da *Tetrahymena*, resultando em um tipo de reação de polimerização do RNA.
- A polinucleotídeo-fosforilase forma reversivelmente polímeros semelhantes ao RNA a partir de ribonucleosídeos 5′-difosfato, adicionando ou removendo ribonucleotídeos na extremidade 3′-hidroxila do polímero. A enzima degrada o RNA *in vivo*.

# 26.3 Síntese de RNA e DNA dependente de RNA

Em nossa discussão sobre a síntese de DNA e RNA até agora, o papel da fita-molde foi reservado ao DNA. Entretanto, algumas enzimas usam um molde de RNA para a síntese de ácido nucleico. Com a exceção muito importante dos vírus com um genoma de RNA, essas enzimas desempenham apenas um modesto papel nas vias de informação. Os vírus de RNA são a fonte da maioria das polimerases RNA-dependentes caracterizadas até agora.

A existência da replicação do RNA precisa de uma elaboração do dogma central (**Figura 26-31**; contraste essa

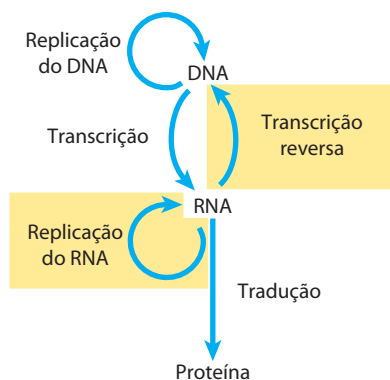



**FIGURA 26-31** Ampliação do dogma central para incluir a síntese de RNA e DNA dependente de RNA.

figura com o diagrama na p. 977). As enzimas envolvidas na replicação do RNA têm implicações profundas para investigações a respeito da natureza das moléculas autorreplicadoras que podem ter existido em tempos pré-bióticos.

## A transcriptase reversa produz DNA a partir de RNA viral

Certos vírus de RNA que infectam as células animais transportam no interior da partícula viral uma DNA-polimerase dependente de RNA chamada de **transcriptase reversa**. Na infecção, o genoma viral de fita única de RNA (~10.000 nucleotídeos) e a enzima entram na célula hospedeira. Primeiro, a transcriptase reversa catalisa a síntese de uma fita de DNA complementar ao RNA viral (**Figura 26-32**), então degrada a fita de RNA do híbrido de RNA-DNA viral e o substitui por DNA. O duplex de DNA resultante frequente-

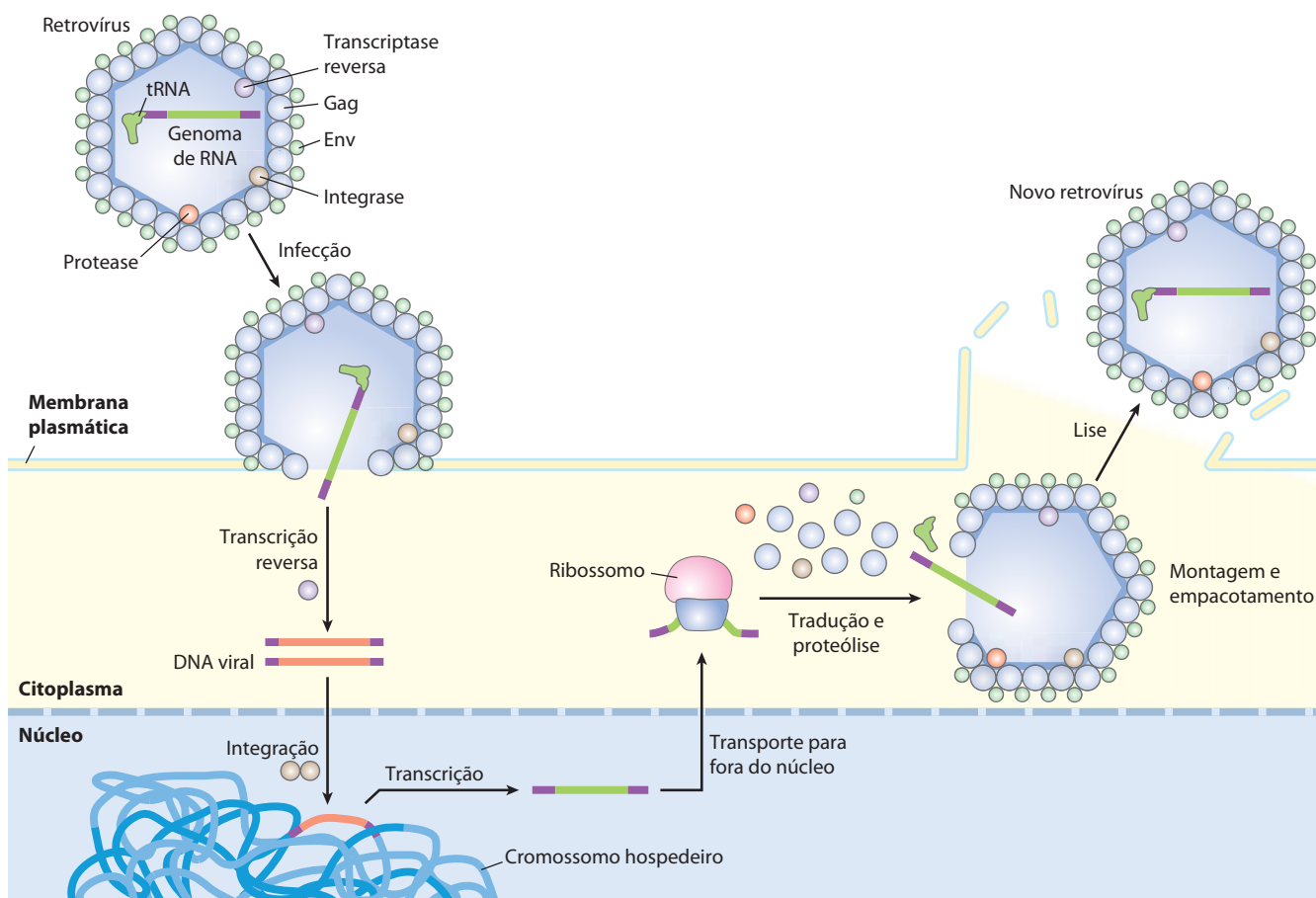



**FIGURA 26-32 Infecção retroviral de uma célula de mamífero e integração do retrovírus no cromossomo do hospedeiro.** Partículas virais que entram na célula hospedeira carregam a transcriptase reversa viral e um tRNA celular (captado de uma célula hospedeira anterior) já pareado ao RNA viral. Os segmentos roxos representam as longas repetições terminais no RNA viral. O tRNA facilita a conversão imediata do RNA viral a DNA de fita dupla pela ação da transcriptase reversa, como descrito no texto. Uma vez convertido em DNA de dupla-hélice, o DNA entra no núcleo e é integrado no genoma do hospedeiro. A integração é catalisada por uma integrase codificada viralmente. A integração do DNA viral no DNA do hospedeiro é mecanicamente semelhante à inserção de transposons em cromossomos bacterianos (ver Figura 25-41). Por exemplo, alguns poucos pares de bases do DNA do hospedeiro se tornam duplicados no sítio de integração, formando repetições curtas de 4 a 6 pb em cada extremidade do DNA retroviral inserido (não mostrado). Na transcrição e tradução do DNA viral integrado, novos vírus são formados e liberados pela lise celular (direita). Nos vírus, o RNA viral é envolvido por proteínas do capsídeo chamadas Gag e proteínas do envoltório externo chamadas Env. Proteínas virais adicionais (transcriptase reversa, integrase e uma protease viral necessária para o processamento pós-tradução das proteínas virais) são acondicionadas no interior de uma partícula de vírus com o RNA.

mente se torna incorporado ao genoma da célula hospedeira eucarionte. Esses genes virais integrados (e dormentes) podem ser ativados e transcritos, e os produtos gênicos – proteínas virais e o próprio genoma de RNA – acondicionados como novos vírus. Os vírus de RNA que contêm transcriptases reversas são conhecidos como **retrovírus** (*retro* é o prefixo latino para "para trás").

A existência de transcriptases reversas em vírus de RNA foi prevista por Howard Temin em 1962, e as enzimas foram, em última análise, detectadas por Temin e, independentemente, por David Baltimore em 1970. Sua descoberta atraiu muita atenção como uma prova que a informação genética pode fluir "para trás", do RNA para o DNA, abalando o dogma da passagem da informação apenas do DNA para o RNA.

Howard Temin, 1934–1994

David Baltimore

Os retrovírus têm geralmente três genes: *gag* (um nome derivado da designação histórica antígeno associado ao grupo, ***g**roup **a**ssociated anti**g**en*), *pol*, e *env* (**Figura 26-33**). O transcrito que contém *gag* e *pol* é traduzido em uma longa "poliproteína", único grande polipeptídeo clivado em seis proteínas com funções distintas. As proteínas derivadas do gene *gag* constituem o núcleo interior da partícula viral. O gene *pol* codifica a protease que cliva o longo polipeptídeo, uma integrase que insere o DNA viral nos cromossomos do hospedeiro e a transcriptase reversa. Muitas transcriptases reversas têm duas subunidades, $\alpha$ e $\beta$. O gene pol especifica a subunidade $\beta$ ($M_r$ 90.000) e a subunidade $\alpha$ ($M_r$ 65.000) é simplesmente um fragmento proteolítico da subunidade $\beta$. O gene *env* codifica as proteínas do envelope viral. Em cada extremidade do genoma de RNA linear se encontram longas sequências de repetições terminais (LTR) de algumas centenas de nucleotídeos. Transcritas no DNA duplex, essas sequências facilitam a integração do cromossomo viral no DNA do hospedeiro e contêm promotores para a expressão do gene viral.

As transcriptases reversas catalisam três reações diferentes: (1) síntese de DNA dependente de RNA, (2) degradação de RNA e (3) síntese de DNA dependente de DNA. Como muitas DNA e RNA-polimerases, as transcriptases reversas contêm $Zn^{2+}$. Cada transcriptase é mais ativa com o RNA do seu próprio vírus, mas cada uma pode ser usada experimentalmente para construir DNA complementar a uma variedade de RNA. As atividades de síntese de DNA e RNA e a degradação do RNA empregam sítios ativos separados na proteína. Para que a síntese de DNA se inicie, a transcriptase reversa precisa de um oligonucleotídeo iniciador, um tRNA celular obtido durante uma infecção anterior e transportado na partícula viral. Esse tRNA pareia as bases na sua extremidade 3′ com uma sequência complementar do RNA viral. A nova fita de DNA é sintetizada na direção 5′→3′, como em todas as reações da RNA e DNA-polimerases. As transcriptases reversas, como as RNA-polimerases, não têm exonucleases revisoras 3′→5′. Elas geralmente têm taxas de erro de cerca de 1 por 20.000 nucleotídeos adicionados. Uma taxa de erro tão alta quanto essa é extremamente incomum na replicação de DNA e parece ser uma característica da maioria das enzimas que replica os genomas de vírus de RNA. Uma consequência é uma taxa de mutação maior e uma taxa mais rápida de evolução viral, fator responsável pelo frequente aparecimento de novas linhagens de retrovírus causadores de doenças.

As transcriptases reversas se tornaram importantes reagentes no estudo das relações DNA-RNA e nas técnicas de clonagem do DNA. Elas tornam possível a síntese de DNA complementar a um molde de mRNA, e o DNA sintetizado preparado dessa maneira, chamado de **DNA complementar** (**cDNA**), pode ser usado para clonar genes celulares (ver Figura 9-14).

**FIGURA 26-33 Estrutura e produtos gênicos de um genoma retroviral integrado.** Repetições terminais longas (LTR) têm sequências necessárias para a regulação e iniciação da transcrição. A sequência denominada $\psi$ é necessária para o acondicionamento dos RNAs retrovirais em partículas virais maduras. A transcrição do DNA retroviral produz um transcrito primário que abrange os genes *gag*, *pol* e *env*. A tradução (Capítulo 27) produz uma poliproteína, um único polipeptídeo longo derivado dos genes *gag* e *pol*, que é clivado em seis proteínas distintas. O *splicing* do transcrito primário produz um mRNA derivado em grande parte do gene *env*, que também é traduzido em uma poliproteína, clivada então para gerar proteínas virais do envelope.

**FIGURA 26-34 Genoma do vírus do sarcoma de Rous.** O gene *src* codifica uma tirosina-cinase, pertencente a uma classe de enzimas que funciona em sistemas que afetam a divisão celular, interações célula a célula e comunicação intercelular (Capítulo 12). O mesmo gene é encontrado no DNA de galinhas (o hospedeiro comum para esse vírus) e nos genomas de muitos outros eucariontes, incluindo humanos. Quando associado ao vírus do sarcoma de Rous, esse oncogene é frequentemente expresso em níveis anormalmente altos, contribuindo para a divisão celular descontrolada e câncer.

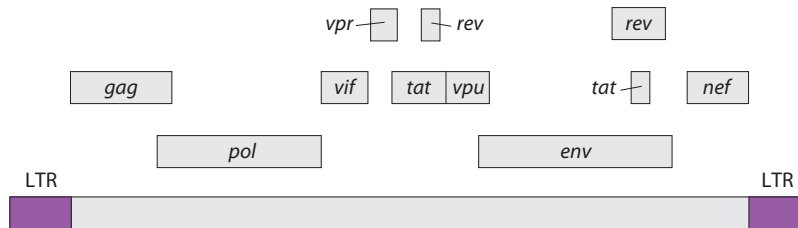



**FIGURA 26-35 O genoma do HIV, o vírus que causa a Aids.** Além dos genes retrovirais típicos, o HIV contém vários pequenos genes com diversas funções (não identificadas aqui e nem todas conhecidas). Alguns desses genes se sobrepõem. Mecanismos de *splicing* alternativo produzem muitas proteínas diferentes a partir deste pequeno genoma (9,7 × $10^3$ nucleotídeos).

## Alguns retrovírus causam câncer e Aids

Os retrovírus têm tido destaque em avanços recentes na compreensão molecular do câncer. A maioria dos retrovírus não mata suas células hospedeiras, mas permanece integrada ao DNA celular, replicando quando a célula se divide. Alguns retrovírus, classificados como vírus RNA-tumorais, contêm um oncogene que pode levar a célula a crescer anormalmente. O primeiro retrovírus desse tipo a ser estudado foi o vírus do sarcoma de Rous (também chamado de vírus do sarcoma aviário; **Figura 26-34**), nomeado a partir de F. Peyton Rous, que estudou tumores de galinhas que, agora se sabe, foram causados por esse vírus. Desde a descoberta inicial dos oncogenes por Harold Varmus e Michael Bishop, muitas dúzias de genes como esses foram encontrados em retrovírus.

O vírus da imunodeficiência humana (HIV), que causa a síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids), é um retrovírus. Identificado em 1983, o HIV tem um genoma de RNA com genes retrovirais padrão junto com vários outros genes incomuns (**Figura 26-35**). Ao contrário de vários outros vírus, o HIV mata muitas das células que ele infecta (principalmente linfócitos T) em vez de provocar a formação de tumores. Isso leva gradualmente à supressão do sistema imune no hospedeiro. A transcriptase reversa do HIV é ainda mais propensa a erros do que outras transcriptases reversas conhecidas – 10 vezes mais – resultando em altas taxas de mutação nesse vírus. Um ou mais erros ocorrem geralmente a cada vez que o genoma viral é replicado, e duas moléculas virais quaisquer provavelmente são diferentes.

Muitas vacinas modernas para infecções virais consistem em uma ou mais proteínas de revestimento do vírus, produzidas pelos métodos descritos no Capítulo 9. Essas proteínas não são infecciosas, mas estimulam o sistema imune a reconhecer e resistir a invasões virais subsequentes (Capítulo 5). Devido à alta taxa de erro da transcriptase reversa do HIV, o gene *env* nesse vírus (junto com o resto do genoma) sofre mutação muito rápida, dificultando o desenvolvimento de uma vacina efetiva. Entretanto, são necessários ciclos repetidos de invasão celular e replicação para propagar uma infecção de HIV, de modo que a inibição de enzimas virais oferece a terapia mais eficiente disponível atualmente. A protease do HIV é o alvo de uma classe de fármacos chamada de inibidores de protease (ver Figura 6-24). A transcriptase reversa é o alvo de alguns fármacos adicionais amplamente usados para tratar indivíduos infectados pelo HIV (Quadro 26-2). ■

## Muitos transposons, retrovírus e íntrons podem ter origem evolutiva comum

Alguns transposons bem conhecidos de DNA de eucariontes de fontes tão diversas quanto leveduras e moscas-da-fruta têm uma estrutura muito semelhante àquela dos retrovírus; eles são às vezes chamados de retrotransposons (**Figura 26-36**). Eles codificam uma enzima homóloga à transcriptase reversa retroviral e suas regiões codificadoras são ladeadas por sequências LTR. Eles se transpõem de uma posição para outra no genoma celular por meio de um RNA intermediário, usando a transcriptase reversa para fazer uma cópia de DNA do RNA, seguida da integração do

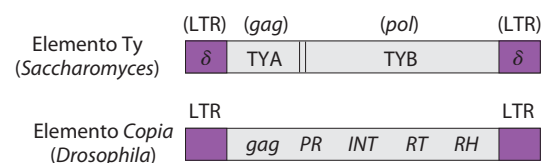



**FIGURA 26-36 Transposons de eucariontes.** O elemento Ty da levedura *Saccharomyces* e o elemento *copia* da mosca-da-fruta *Drosophila* servem como exemplos de retrotransposons de eucariontes, que frequentemente têm uma estrutura semelhante à dos retrovírus, mas não têm o gene *env*. As sequências δ do elemento Ty são funcionalmente equivalentes às LTR retrovirais. No elemento *copia*, *INT* e *RT* são homólogos aos segmentos da integrase e transcriptase reversa, respectivamente, do gene *pol*.

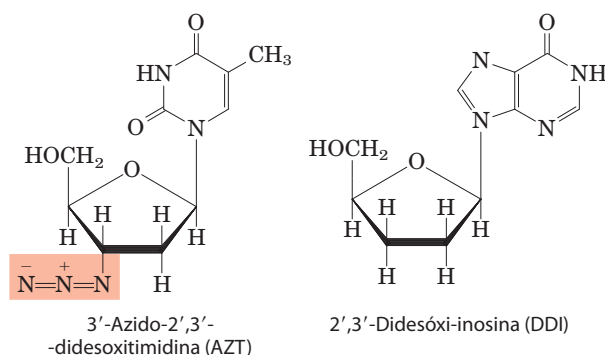
**QUADRO 26-2 MEDICINA Combatendo a Aids com inibidores da transcriptase reversa do HIV**

Pesquisas sobre a química da biossíntese de ácidos nucleicos dependentes de molde combinadas a técnicas modernas de biologia molecular elucidaram o ciclo de vida e a estrutura do vírus da imunodeficiência, o retrovírus que causa Aids. Poucos anos após o isolamento do HIV, essa pesquisa resultou no desenvolvimento de fármacos capazes de prolongar as vidas de pessoas infectadas pelo HIV.

O primeiro fármaco aprovado para uso clínico foi o AZT, análogo estrutural da desoxitimidina. O AZT foi sintetizado pela primeira vez em 1964 por Jerome P. Horwitz. Ele fracassou como fármaco anticâncer (o propósito para o qual foi fabricado), mas em 1985 foi descoberta a sua eficácia no tratamento da Aids.

O AZT é captado pelos linfócitos T, células do sistema imune particularmente vulneráveis à infecção pelo HIV, e convertido em trifosfato de AZT (o consumo direto de trifosfato de AZT seria ineficaz, pois ele não consegue atravessar a membrana plasmática). A transcriptase reversa do HIV tem uma afinidade maior pelo trifosfato de AZT do que por dTTP, e a ligação de trifosfato de AZT a essa enzima inibe competitivamente a ligação ao dTTP. Quando o AZT é adicionado à extremidade 3′ da fita de DNA em crescimento, a ausência de uma hidroxila 3′ significa que a fita de DNA é encerrada prematuramente e que a síntese do DNA viral sofre uma parada. O trifosfato de AZT não é igualmente tóxico para os próprios linfócitos T porque as DNA-polimerases *celulares* têm uma afinidade menor por esse composto do que pelo dTTP. Em concentrações de 1 a 5 $\mu$M, o AZT afeta a transcrição reversa mas não a maior parte da replicação do DNA celular. Infelizmente o AZT parece ser tóxico para as células da medula óssea que são as progenitoras dos eritrócitos, e muitos indivíduos tomando AZT desenvolvem anemia. O AZT pode aumentar o tempo de sobrevivência de pessoas com Aids avançada em cerca de um ano, e retarda a implantação da Aids naqueles que ainda estão nos estágios iniciais da infecção pelo HIV. Alguns outros compostos para Aids, como a didesóxi-inosina (DDI), têm um mecanismo de ação similar. Novos fármacos têm como alvo e inativam a protease do HIV. Devido à alta taxa de erro da transcriptase reversa do HIV e à rápida evolução resultante desse vírus, os tratamentos mais eficazes da infecção pelo HIV usam uma combinação de compostos direcionada tanto para a protease quanto para a transcriptase reversa.

3′-Azido-2′,3′-dideoxitimidina (AZT)

2′,3′-Didesóxi-inosina (DDI)

DNA ao novo local. A maioria dos transposons em eucariontes usa esse mecanismo para transposição, distinguindo-os dos transposons bacterianos, que se movem como DNA diretamente de uma localização no cromossomo para outra (ver Figura 25-41).

Os retrotransposons não têm um gene *env* e, portanto, não podem formar partículas virais. Podem ser considerados vírus defeituosos, capturados pelas células. Comparações entre retrovírus e transposons de eucariontes sugerem que a transcriptase reversa seja uma antiga enzima, anterior à evolução de organismos multicelulares.

De modo interessante, muitos íntrons do grupo I e II também são elementos genéticos móveis. Além de suas atividades de *autosplicing*, eles codificam endonucleases de DNA que promovem seu movimento. Durante trocas genéticas entre células da mesma espécie, ou quando o DNA é introduzido em uma célula por parasitas ou por outros meios, essas endonucleases promovem a inserção do íntron em um local idêntico de outra cópia de DNA de um gene homólogo que não contenha o íntron, em um processo denominado ***homing*** (endereçamento, **Figura 26-37**). Enquanto o *homing* do íntron do grupo I se baseia no DNA, o *homing* do íntron do grupo II ocorre por um intermediário de RNA. As endonucleases dos íntrons do grupo II têm uma atividade associada de transcriptase reversa. As proteínas podem formar complexos com os próprios íntrons de RNA depois que os íntrons sofrem *splicing* dos transcritos primários. Como o processo de *homing* envolve a inserção do íntron de RNA no DNA e a transcrição reversa do íntron, o movimento desses íntrons foi chamado de *retrohoming*. Ao longo do tempo, cada cópia de um gene em particular em uma população pode adquirir o íntron. Muito mais raramente, o íntron pode inserir a si mesmo em uma nova localização em um gene não relacionado. Se esse evento não matar a célula hospedeira, ele pode levar à evolução e distribuição de um íntron em uma nova localização. As estruturas e mecanismos usados por íntrons móveis apoiam a ideia de que pelo menos alguns íntrons se originaram como parasitas moleculares cujo passado evolutivo pode ser traçado aos retrovírus e transposons.

## A telomerase é uma transcriptase reversa especializada

Os telômeros, as estruturas nas extremidades dos cromossomos lineares de eucariontes (ver Figura 24-8), geralmente consistem em várias cópias em tandem de uma pequena sequência de oligonucleotídeos. Essa sequência geralmente tem a forma $T_xG_y$ em uma fita e $C_yA_x$ na fita complementar,

**FIGURA 26-37 Íntrons que se movem: *homing* e *retrohoming*.** Certos íntrons incluem um gene (mostrado em vermelho) para enzimas que promove *homing* (certos íntrons do grupo I) ou *retrohoming* (certos íntrons do grupo II). **(a)** O gene no íntron que sofreu *splicing* é ligado por um ribossomo e traduzido. Os íntrons do grupo I que sofrem *homing* especificam uma endonuclease específica do sítio, chamada de uma endonuclease *homing*. Os íntrons do grupo II que sofrem *retrohoming* especificam uma proteína tanto com atividades de endonuclease quanto de transcriptase reversa (não mostradas aqui).

**(b)** *Homing*. O alelo *a* de um gene *X* contendo um íntron do grupo I que sofre *homing* está presente em uma célula contendo o alelo *b* do mesmo gene, que não possui o íntron. A endonuclease de *homing* produzida por *a* cliva *b* na posição que corresponde ao íntron em *a* e o reparo da quebra da fita dupla (recombinação com o alelo *a*; ver Figura 25-35) cria então uma nova cópia do íntron em *b*. **(c)** *Retrohoming*. O alelo *a* do gene *Y* contém um íntron do grupo II que sofre *retrohoming*; o alelo *b* não tem o íntron. O íntron que sofre *splicing* insere a si mesmo na fita codificadora de *b* em uma reação que é o inverso do *splicing* que retirou o íntron do transcrito primário (ver Figura 26-15), exceto que aqui a inserção é no DNA em vez de no RNA. A fita de DNA não codificador de *b* é então clivada pela endonuclease/transcriptase reversa codificada no íntron. Essa mesma enzima usa o RNA inserido como um molde para sintetizar uma fita de DNA complementar. O RNA é então degradado pelas ribonucleases celulares e substituído por DNA.

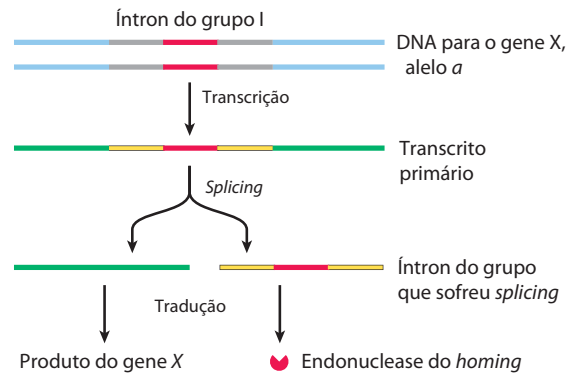
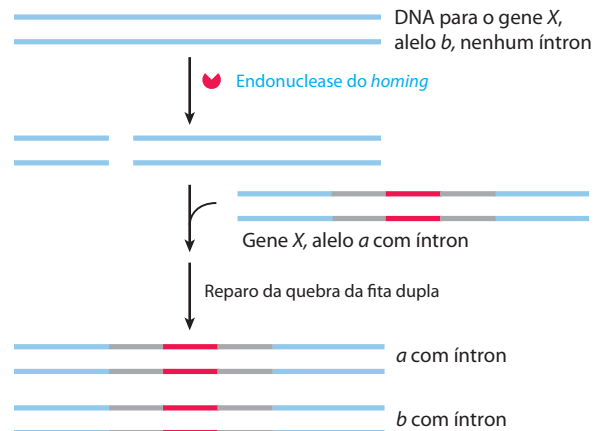
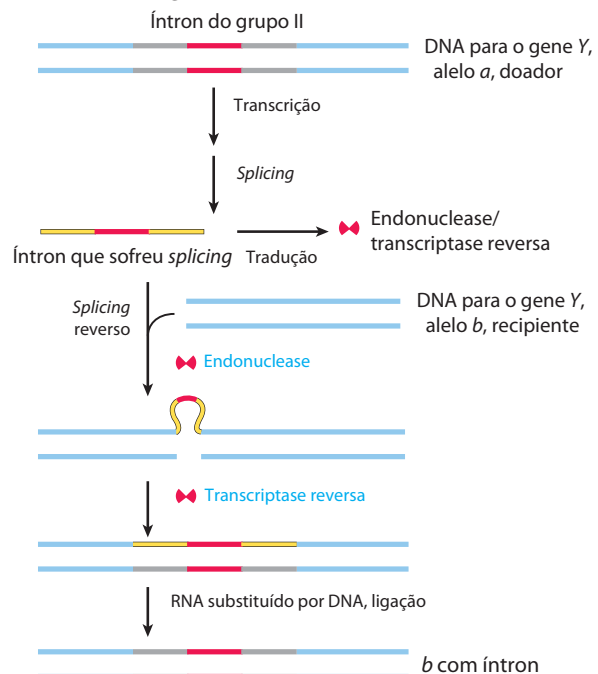
onde $x$ e $y$ estão geralmente na faixa de 1 a 4 (p. 984). Os telômeros variam em comprimento de algumas poucas dúzias de pares de bases em alguns protozoários ciliados a dezenas de milhares de pares de bases em mamíferos. A fita TG é mais longa do que o seu complemento, deixando uma região de DNA de fita simples de até algumas centenas de nucleotídeos na extremidade 3′.

As extremidades de um cromossomo linear não são prontamente replicadas pelas DNA-polimerases celulares. A replicação do DNA precisa de um molde e de um oligonucleotídeo iniciador, e além da extremidade de uma molécula de DNA linear nenhum molde está disponível para o pareamento de um oligonucleotídeo iniciador de RNA. Sem um mecanismo especial para duplicar as extremidades, os cromossomos ficaram um pouco menores a cada geração celular. A enzima **telomerase**, descoberta por Carol Greider e Elizabeth Blackburn, soluciona esse problema adicionando telômeros às extremidades do cromossomo.

Carol Greider

Elizabeth Blackburn

A descoberta e a purificação dessa enzima permitiram evidenciar um mecanismo de reação impressionante e sem precedentes. A telomerase, como algumas outras enzimas descritas nesse capítulo, contém componentes de RNA e proteicos. O componente de RNA tem cerca de 150 nu-

cleotídeos de comprimento e contém cerca de 1,5 cópia da repetição $C_yA_x$ adequada do telômero. Essa região do RNA atua como um molde para a síntese da fita $T_xG_y$ do telômero.

A telomerase atua, portanto, como uma transcriptase reversa celular que fornece o sítio ativo para a síntese de DNA dependente de RNA. Ao contrário das transcriptases reversas retrovirais, a telomerase copia apenas um pequeno fragmento de RNA que ela transporta no seu interior. A síntese do telômero precisa da extremidade 3′ de um cromossomo como iniciador e prossegue na direção normal 5′→3′. Tendo sintetizado uma cópia da repetição, a enzima se reposiciona para retomar a extensão do telômero (**Figura 26-38a**).

Após a extensão da fita $T_xG_y$ pela telomerase, a fita complementar $C_yA_x$ é sintetizada pelas DNA-polimerases celulares, começando com um oligonucleotídeo iniciador de RNA (ver Figura 25-12). A região de fita simples é protegida por proteínas de ligação específicas em vários eucariontes inferiores, especialmente aquelas espécies com telômeros com menos de algumas centenas de pares de bases. Em eucariontes superiores (incluindo mamíferos) com telômeros de muitos milhares de pares de bases de comprimento, a extremidade de fita única é sequestrada em uma estrutura especializada chamada de **alça T** (Figura 26-38b). A extremidade de fita única é dobrada para trás e pareada com o seu complemento na porção de fita dupla do telômero. A formação de uma alça em T envolve a invasão da extre-

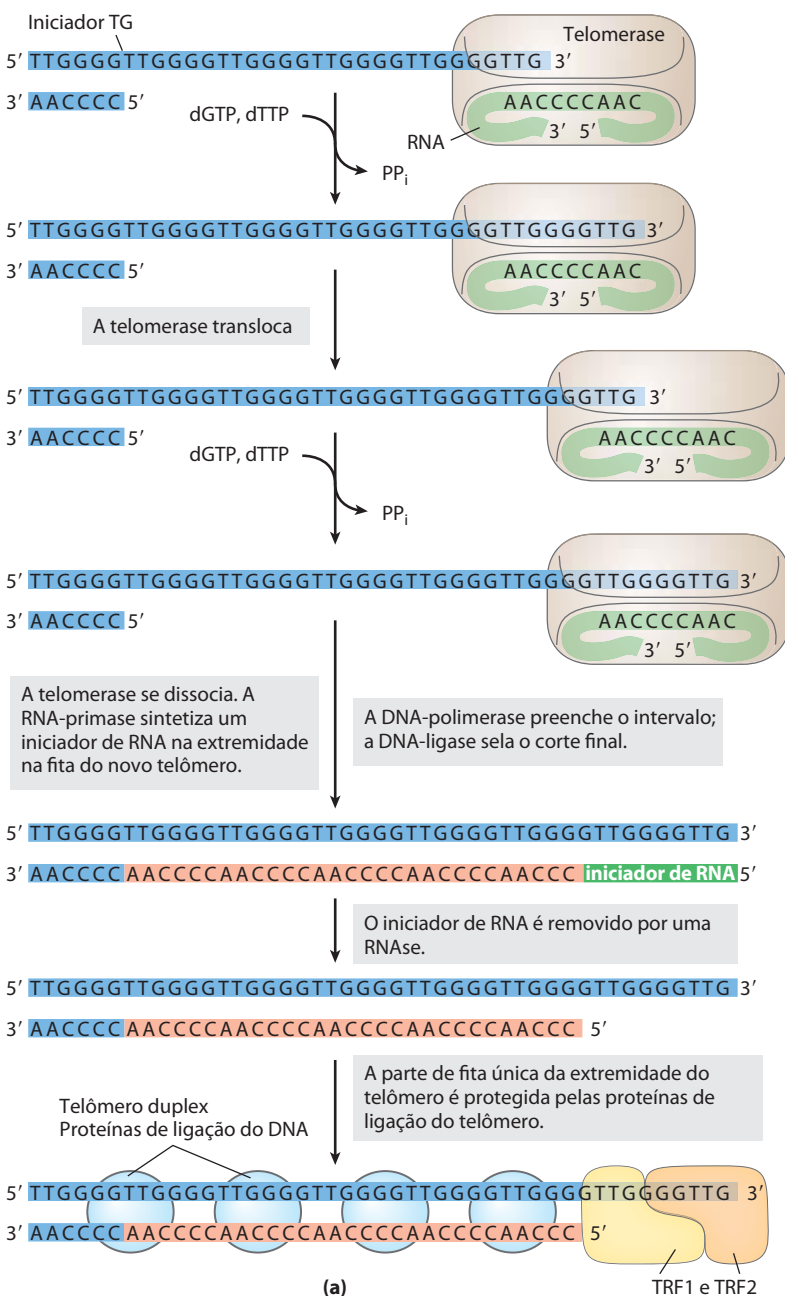



**FIGURA 26-38 Síntese e estrutura do telômero. (a)** O molde interno de RNA se liga e pareia suas bases com o iniciador TG ($T_xG_y$) de DNA. A telomerase adiciona mais resíduos de T e G ao iniciador TG e então reposiciona o molde interno de RNA para permitir a adição de mais resíduos de T e G que geram a fita TG do telômero. A fita complementar é sintetizada pelas DNA-polimerases celulares após *priming* por uma RNA-primase. **(b)** Estrutura proposta de alças T em telômeros. A cauda de fita única sintetizada pela telomerase é dobrada para trás e pareada com seu complemento na porção duplex do telômero. O telômero é ligado por várias proteínas ligadoras do telômero, incluindo TRF1 e TRF2 (fatores de ligação a repetições teloméricas). **(c)** Eletromicrografia de uma alça em T na extremidade de um cromossomo isolado do hepatócito de um camundongo. A barra na parte de baixo da micrografia representa um comprimento de 5.000 pb.

midade 3′ da fita única do telômero formando um duplex de DNA, talvez por um mecanismo semelhante à iniciação da recombinação genética homóloga (ver Figura 25-35). Em mamíferos, o DNA em alça é ligado por duas proteínas, TRF1 e TRF2, a última envolvida na formação da alça T. Essas alças protegem as extremidades 3′ dos cromossomos, tornando-as inacessíveis às nucleases e enzimas que reparam as interrupções da fita dupla.

Em protozoários (como a *Tetrahymena*), a perda de atividade da telomerase resulta em um encurtamento gradual dos telômeros a cada divisão celular, em última análise levando à morte da linhagem celular. Uma ligação semelhante entre o comprimento do telômero e a senescência celular (interrupção da divisão celular) foi observada em seres humanos. Em células germinativas, que contêm atividade de telomerase, os comprimentos dos telômeros são mantidos; em células somáticas, que não apresentam telomerase, eles não são. Há uma relação linear e inversa entre o comprimento dos telômeros de fibroblastos em cultura e a idade dos indivíduos dos quais os fibroblastos foram retirados: os telômeros em células somáticas humanas encurtam gradualmente à medida que um indivíduo envelhece. Se a telomerase da transcriptase reversa é introduzida em células somáticas humanas *in vitro*, a atividade de telomerase é restaurada e a duração da vida celular aumenta acentuadamente.

O encurtamento gradual dos telômeros é a chave para o processo de envelhecimento? A duração do nosso ciclo de vida natural é determinada pelo comprimento dos telômeros com os quais os seres humanos nascem? Pesquisas adicionais nessa área devem fornecer algumas informações fascinantes.

## Alguns RNAs virais são replicados por RNA-polimerase dependente de RNA

Alguns bacteriófagos de *E. coli*, incluindo f2, MS2, R17 e Q$\beta$, bem como alguns vírus de eucariontes (incluindo os vírus influenza e Sindbis, o último associado a uma forma de encefalite) têm genomas de RNA. Os cromossomos de RNA de fita simples desses vírus, que também funcionam como mRNA para a síntese de proteínas virais, são replicados na célula hospedeira por uma **RNA-polimerase dependente de RNA** (**RNA-replicase**). Todos os vírus de RNA – com a exceção dos retrovírus – devem codificar uma proteína com atividade de RNA-polimerase dependente de RNA, pois as células hospedeiras não têm essa enzima.

A RNA-replicase da maioria dos bacteriófagos de RNA tem um peso molecular de ~210.000 e consiste em quatro subunidades. Uma subunidade ($M_r$ 65.000) é o produto do gene da replicase codificado pelo RNA viral e tem o sítio ativo para replicação. As outras três subunidades são proteínas hospedeiras normalmente envolvidas na síntese proteica da célula hospedeira: os fatores de alongamento da *E. coli* Tu ($M_r$ 45.000) e Ts ($M_r$ 34.000) (que transportam os aminoacil-tRNAs aos ribossomos) e a proteína S1 (parte integral da subunidade ribossomal 30S). Essas três proteínas hospedeiras podem ajudar a RNA-replicase a localizar e a se ligar às extremidades 3′ dos RNAs virais.

A RNA-replicase isolada das células de *E. coli* infectadas por Q$\beta$ catalisa a formação de um RNA complementar ao RNA viral, em uma reação equivalente àquela catalisada por RNA-polimerases dependentes de DNA. A síntese de nova fita de RNA prossegue na direção 5′→3′ por um mecanismo químico idêntico àquele usado em todas as outras reações de síntese de ácidos nucleicos que precisam de um molde. A RNA-replicase precisa de RNA como seu molde e não funcionará com DNA. Ela não tem uma atividade de revisão de endonuclease separada e tem uma taxa de erro semelhante àquela da RNA-polimerase. Ao contrário das DNA e RNA-polimerases, as RNA-replicases são específicas para o RNA de seu próprio vírus; os RNA da célula hospedeira não são em geral replicados. Isso explica como os vírus de RNA são preferencialmente replicados na célula hospedeira, que contém muitos outros tipos de RNA.

## A síntese de RNA oferece pistas importantes para a evolução bioquímica

A complexidade e a ordem extraordinárias que distinguem os sistemas vivos dos inanimados são manifestações essenciais de processos vitais fundamentais. A manutenção do estado vivo requer que transformações químicas *seletivas* ocorram muito rapidamente – especialmente aquelas que usam fontes de energia do meio e sintetizam macromoléculas celulares elaboradas ou especializadas. A vida depende de catalisadores poderosos e seletivos – enzimas – e de sistemas de informação capazes tanto de armazenar de modo seguro o modelo dessas enzimas quanto de reproduzir acuradamente esse modelo geração após geração. Os cromossomos codificam o molde não para a célula, mas para as enzimas que constroem e mantêm a célula. As demandas paralelas por informação e catálise apresentam um enigma clássico: o que veio primeiro, a informação necessária para especificar a estrutura ou as enzimas necessárias para manter e transmitir a informação?

Carl Woese, 1928-2012

Francis Crick, 1916–2004

Leslie Orgel, 1927–2007

A revelação da complexidade estrutural e funcional do RNA levou Carl Woese, Francis Crick e Leslie Orgel a proporem nos anos 1960 que essa molécula poderia servir tanto como transportadora de informação quanto como catalisadora. A descoberta de RNA catalisadores conduziu essa proposta de

conjectura à hipótese e levou à ampla especulação de que um "mundo de RNA" pode ter sido importante na transição da química pré-biótica para a vida (ver Figura 1-36). O progenitor de toda a vida nesse planeta, no sentido de que ele poderia reproduzir a si mesmo ao longo das gerações da origem da vida ao momento atual, pode ter sido uma molécula de RNA autorreplicadora ou um polímero com características químicas equivalentes.

Como pode ter surgido um polímero autorreplicador? Como ele poderia ter mantido a si mesmo em um meio em que os precursores para a síntese do polímero são escassos? Como poderia a evolução progredir de tal polímero para o mundo moderno de DNA-proteína? Essas perguntas difíceis podem ser abordadas por meio de experimentação cuidadosa, fornecendo pistas a respeito de como começou e evoluiu a vida na Terra. A origem provável das bases de purina e pirimidina é sugerida por experimentos projetados para testar hipóteses acerca da química pré-biótica (p. 33-34). A partir de moléculas simples que se acredita estavam presentes na atmosfera inicial ($CH_4$, $NH_3$, $H_2O$, $H_2$), descargas elétricas como relâmpagos geram, primeiro, moléculas mais reativas como o HCN e aldeídos, então um conjunto de aminoácidos e ácidos orgânicos (ver Figura 1-34). Quando moléculas como o HCN se tornam abundantes, as bases purina e pirimidina são sintetizadas em quantidades detectáveis. Notavelmente, uma solução concentrada de cianeto de amônia, submetida a refluxo por alguns dias, produz adenina com rendimentos de até 0,5% (**Figura 26-39**). A adenina pode muito bem ter sido o primeiro e mais abundante constituinte de nucleotídeo a aparecer na Terra. Curiosamente, a maioria dos cofatores enzimáticos contém adenosina como parte da sua estrutura, embora ela não desempenhe nenhum papel direto na função do cofator (ver Figura 8-38). Talvez isso sugira uma relação evolutiva. Com base na síntese simples de adenina a partir de cianeto, a adenina pode simplesmente ter sido abundante e disponível.

A hipótese do mundo de RNA precisa de um polímero de nucleotídeos para reproduzir a si mesmo. Uma ribozima pode acarretar sua própria síntese a partir de um molde? Os pesquisadores estão próximos de encontrar tal ribozima ou sistema de ribozimas. Por exemplo, Gerald Joyce e colaboradores, em 2009, relataram o primeiro conjunto de duas ribozimas que poderiam fazer a catálise cruzada da formação de cada um (**Figura 26-40**). Uma ribozima, E, catalisa a ligação de dois oligonucleotídeos (A′ e B′) para criar uma segunda ribozima complementar chamada E′. E′ poderia então catalisar a ligação de dois outros oligonucleotídeos (A e B) para formar outra molécula de E. Nesse sistema, a formação de E e E′ foi baseada em molde, e as quantidades

**FIGURA 26-39 Possível síntese pré-biótica de adenina a partir de cianeto de amônia.** A adenina é derivada de cinco moléculas de cianeto, indicadas pelo sombreamento.

cresceram exponencialmente enquanto substratos estiveram disponíveis e as proteínas estavam ausentes. O sistema evoluiu de modo que enzimas mais eficientes apareceram na população. Uma ribozima mais geral semelhante à RNA-polimerase foi descrita em 2011 por Philipp Holliger e colaboradores. De fato, o ritmo das descobertas nesse campo está se acelerando.

Um polímero autorreplicador usaria rapidamente os suprimentos disponíveis de precursores fornecidos pelos processos relativamente lentos da química pré-biótica. Portanto, desde um estágio inicial da evolução, seriam necessárias vias metabólicas para gerar precursores de maneira eficiente, com a síntese de precursores presumivelmente catalisada por ribozimas. As ribozimas encontradas na natureza têm um repertório limitado de funções catalíticas e não há qualquer vestígio das ribozimas que podem ter um dia existido. A fim de explorar a hipótese do mundo de RNA mais profundamente, é preciso saber se o RNA tem o potencial de catalisar várias reações diferentes necessárias em um sistema primitivo de vias metabólicas.

A busca por RNA com novas funções catalíticas foi auxiliada pelo desenvolvimento de um método que rapidamente busca conjuntos de polímeros de RNA aleatórios e extrai aqueles com atividades particulares: o **SELEX** é nada menos do que a evolução acelerada em um tubo de ensaio (Quadro 26-3). Ele tem sido usado para gerar moléculas de RNA que se ligam a aminoácidos, corantes orgânicos, nucleotídeos, cianocobalamina e outras moléculas. Os pesquisadores isolaram ribozimas que catalisam a formação de ligações de ésteres e amidas, reações $S_N2$, metalação (adição de íons metálicos a) de porfirinas e formação de ligações carbono-carbono. A evolução de cofatores enzimáticos com "alças" de nucleotídeos que facilitam sua ligação a ribozimas pode ter expandido ainda mais o repertório de processos químicos disponíveis para os sistemas metabólicos primitivos.

Como será visto no próximo capítulo, algumas moléculas de RNA naturais catalisam a formação de ligações peptídicas, oferecendo uma ideia de como o mundo de RNA pode ter sido transformado pelo maior potencial catalítico das proteínas. A síntese de proteínas teria sido um evento importante na evolução do mundo de RNA, mas também teria apressado o seu desaparecimento. O papel de transportador da informação do RNA pode ter passado para o DNA porque ele é quimicamente mais estável. A RNA-replicase e a transcriptase reversa podem ser versões modernas de enzimas que um dia desempenharam papéis importantes em fazer a transição para o sistema moderno baseado em DNA.

A hipótese do mundo de RNA é agora apoiada por pelo menos cinco linhas de evidência. Em primeiro lugar, catalisadores de RNA existem. O RNA, portanto, claramente tem a capacidade tanto de armazenar a informação quanto de catalisar reações. Em segundo lugar, a ampla faixa de reações para as quais os catalisadores de RNA se desenvolveram é suficiente para formar a base de um sistema metabólico primordial. Em terceiro, há numerosos RNA existentes, provavelmente vestígios de um mundo de RNA, incluindo ribozimas, retrovírus, vírus de RNA e retrotransposons. Em quarto lugar, um catalisador de RNA é responsável pela síntese de proteínas (Capítulo 27). Finalmente, catalisadores

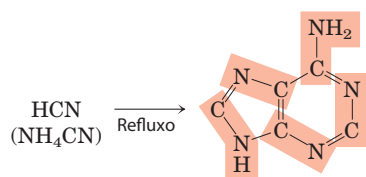
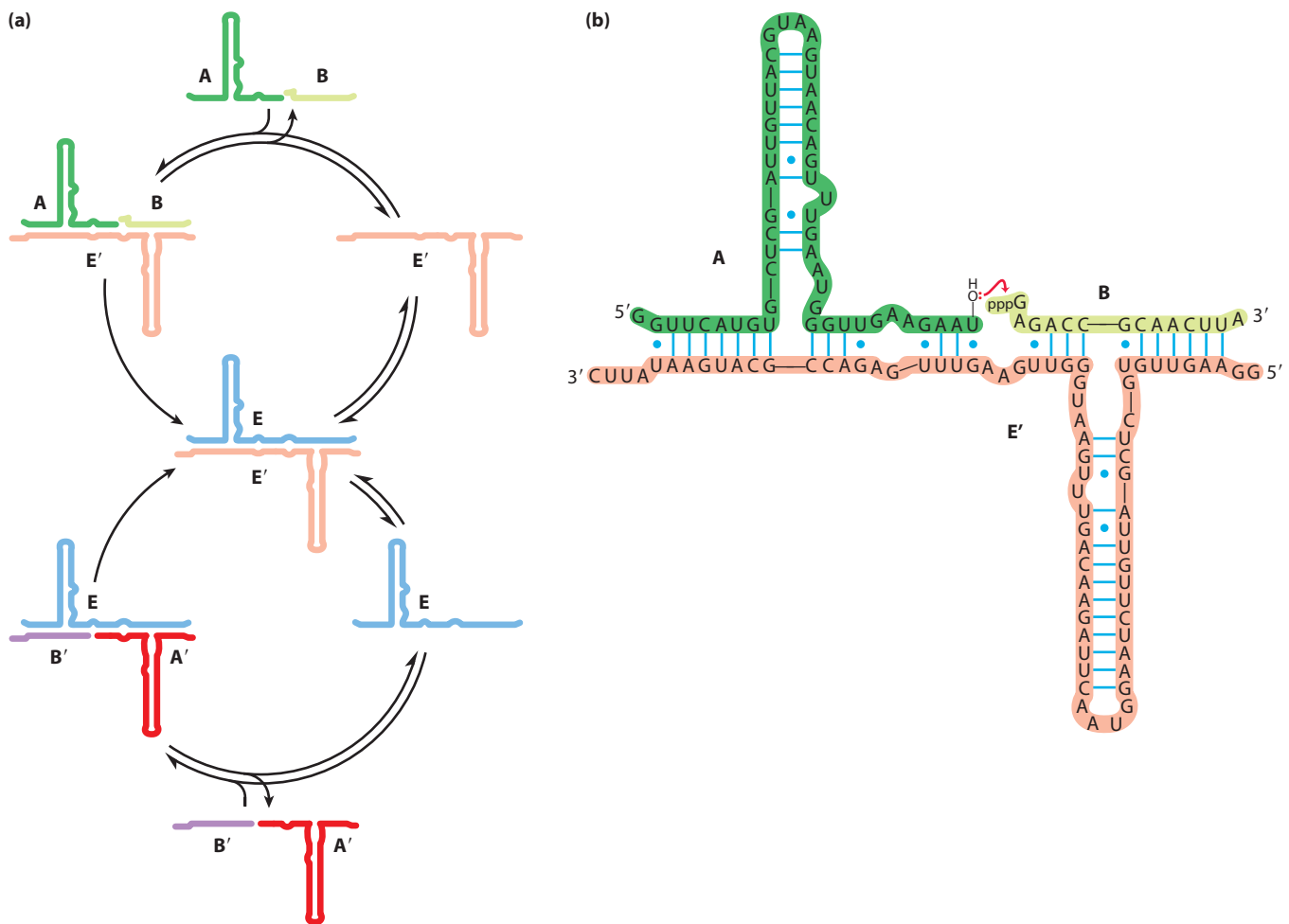



**FIGURA 26-40 Replicação autossustentada de uma enzima de RNA.** Esse sistema tem muitas propriedades de um sistema vivo. As moléculas de RNA incorporam informação e função catalítica, e as reações produzem um aumento exponencial nos RNA produzidos. Quando variantes dos substratos de RNA são introduzidas, o sistema passa por seleção natural de modo que os melhores replicadores acabam por dominar a população. **(a)** O esquema da reação é destacado. Oligorribonucleotídeos A e B hibridizam com a ribozima E′ e são ligados cataliticamente para formar a ribozima E. A união dos oligorribonucleotídeos A′ e B′ é de modo semelhante catalisada pela ribozima E. Os níveis de E e E′ crescem exponencialmente, com um tempo de duplicação de cerca de uma hora a 42ºC, desde que haja um suprimento de precursores A, B, A′ e B′. **(b)** A reação de ligação envolve ataque da 3′OH de um oligorribonucleotídeo no $\alpha$-fosfato do 5′-trifosfato do outro oligorribonucleotídeo. O pirofosfato é liberado. O pareamento de bases dos substratos com a ribozima desempenha um papel fundamental em alinhar os substratos para a reação.

de RNA com capacidade de autorreplicação estão sendo descobertos em laboratório. Um campo de investigação ativo – química pré-biótica (não descrito aqui) – está revelando vias plausíveis para o aparecimento dos precursores de nucleotídeos na sopa pré-biótica.

Parasitas moleculares podem também ter se originado em um mundo de RNA. Com a aparência dos primeiros autorreplicadores ineficientes, a transposição pode ter sido uma alternativa potencialmente importante à replicação como uma estratégia para a reprodução bem-sucedida e a sobrevivência. Os RNAs parasitas iniciais iriam simplesmente se transformar em uma molécula autorreplicadora por meio de transesterificação catalisada e então sofrer replicação passivamente. A seleção natural teria levado a transposição a ser sítio-específica, tendo como alvo sequências que não interferiam com as atividades catalíticas do RNA hospedeiro. Os replicadores e os transposons de RNA podem ter existido em uma relação simbiótica primitiva, cada um contribuindo para a evolução do outro. Os íntrons modernos, retrovírus e transposons podem todos ser vestígios de uma estratégia de "sobreposição" seguida por RNAs parasitas iniciais. Esses elementos continuam a fazer importantes contribuições para a evolução dos seus hospedeiros.

Embora o mundo de RNA permaneça uma hipótese, com muitas lacunas ainda a serem explicadas, evidências experimentais dão apoio a uma lista crescente de seus elementos-chave. Experimentação adicional deve aumentar nosso entendimento. Pistas importantes para o quebra-cabeça serão encontradas nos trabalhos da química fundamental, em células vivas, ou talvez em outros planetas. Enquanto isso, o universo de RNA continua a se expandir (Quadro 26-4).

## QUADRO 26-3 MÉTODOS O método SELEX para gerar polímeros de RNA com novas funções

O **SELEX** (evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial) é usado para gerar **aptâmeros**, oligonucleotídeos selecionados para se ligar firmemente a um alvo molecular específico. O processo é geralmente automatizado para permitir identificação rápida de um ou mais aptâmeros com a especificidade de ligação desejada.

A Figura Q-1 ilustra como o SELEX é usado para selecionar uma espécie de RNA que se liga firmemente ao ATP. Na etapa ❶, uma mistura aleatória de polímeros de RNA é submetida a "seleção não natural" passando-a por uma resina à qual ATP está ligado. O limite prático para a complexidade de uma mistura de RNA no SELEX é de cerca de $10^{15}$ sequências diferentes, o que permite a aleatorização completa de 25 nucleotídeos ($4^{25} = 10^{15}$). Para RNAs maiores, o conjunto de RNA usado para iniciar a busca não inclui todas as sequências possíveis. Na etapa ❷, polímeros de RNA que passam pela coluna são descartados; na etapa ❸, aqueles que se ligam ao ATP são lavados da coluna com solução salina e coletados. Na etapa ❹, os polímeros de RNA coletados são amplificados pela transcriptase reversa para construir muitos complementos de DNA para os RNAs selecionados; então uma RNA-polimerase faz muitos complementos de RNA a partir das moléculas de DNA resultantes. Na etapa ❺, esse novo conjunto de RNAs é submetido ao mesmo procedimento de seleção e o ciclo é repetido uma dúzia de vezes ou mais. Ao final, apenas alguns aptâmeros – nesse caso, as sequências de RNA com afinidade considerável por ATP – permanecem.

As características da sequência crítica de um aptâmero de RNA que se liga ao ATP são mostradas na Figura Q-2; moléculas com essa estrutura geral se ligam ao ATP (e outros nucleotídeos de adenosina) com $K_d < 50\ \mu$M. A Figura Q-3 apresenta a estrutura tridimensional de um aptâmero de RNA de 36 nucleotídeos (mostrado como um complexo com o AMP) gerado pelo SELEX. Esse RNA tem a estrutura básica mostrada na Figura Q-2.

Além do seu uso na exploração da funcionalidade potencial do RNA, o SELEX tem um lado prático importante ao definir os RNA pequenos com uso farmacêutico. Encontrar um aptâmero que se ligue especificamente a cada alvo potencialmente terapêutico pode ser impossível, mas a capacidade do SELEX de selecionar rapidamente e amplificar uma sequência de oligonucleotídeos específicos a partir de um conjunto altamente complexo de sequências o torna uma abordagem promissora para a produção de novas terapias. Por exemplo, se poderia selecionar um RNA que se liga fortemente a uma proteína receptora proeminente na membrana plasmática de células em um tumor cancerígeno específico. Bloquear a atividade do receptor ou direcionar uma toxina para as células tumorais ao ligá-la ao aptâmero mataria as células. O SELEX também tem sido usado para selecionar aptâmeros de DNA que detectam esporos do antraz. Muitas outras aplicações promissoras se encontram em desenvolvimento. ■

**FIGURA Q-1** O procedimento SELEX.

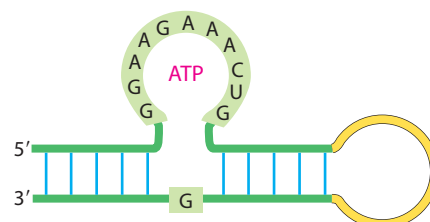



**FIGURA Q-2** Aptâmero de RNA que se liga ao ATP. Os nucleotídeos sombreados são aqueles necessários para a atividade de ligação.

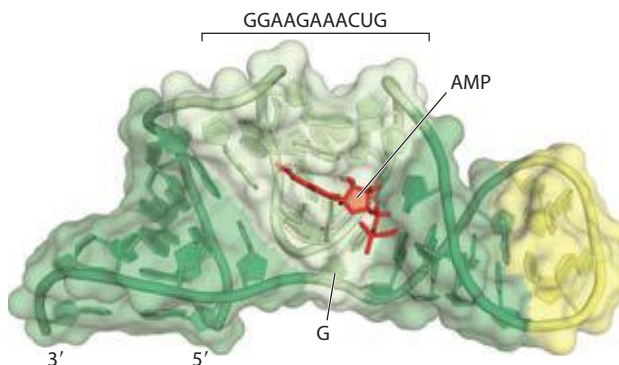



**FIGURA Q-3** (Derivado do PDB ID 1RAW) Aptâmero de RNA ligado ao AMP. As bases dos nucleotídeos conservados (formando o bolsão de ligação) estão brancas; o AMP ligado é vermelho.

## QUADRO 26-4 Universo de RNA em expansão com RNA TUF

Estimativas atuais do número de genes no genoma humano, e em muitos outros genomas, são mencionadas em vários locais ao longo desse texto. Essas estimativas pressupõem que os cientistas conheçam um gene quando se deparam com ele, com base em nossa compreensão atual do DNA, RNA e proteínas. Esse pressuposto é correto?

Como observado no Capítulo 9, menos de 2% do genoma humano parece codificar proteínas. Mesmo quando os íntrons são levados em conta, pode-se esperar que apenas uma minúscula fração do genoma seja transcrita em RNA, principalmente mRNA para codificar aquelas proteínas. O resto do genoma tem sido algumas vezes chamado de DNA lixo. A alcunha "lixo" simplesmente reflete nossa ignorância, que lentamente está dando lugar ao reconhecimento de que a maior parte do genoma é inteiramente funcional. Em um esforço para melhor mapear os limites do transcriptoma humano, os pesquisadores desenvolveram novas ferramentas para determinar com maior precisão quais sequências genômicas são transcritas em RNA. As respostas são surpreendentes. Muito mais do nosso genoma é transcrito em RNA do que qualquer pessoa supunha. A maior parte desse RNA parece não codificar proteínas. A maioria dele não apresenta algumas das estruturas – p. ex., a cauda 3′ de poli(A) – que caracteriza o mRNA. Então o que esse RNA está fazendo?

A maioria dos métodos de abordagem desse assunto cai em duas categorias amplas: clonagem de cDNA e microarranjos. A criação de uma biblioteca de cDNA para estudar os genes transcritos em um genoma particular de eucariontes é descrita no Capítulo 9 (ver Figura 9-14). Entretanto, os métodos clássicos para produzir cDNA frequentemente levam à clonagem de apenas parte da sequência de um certo transcrito. Como a transcriptase reversa pode interromper sua atividade em regiões da estrutura secundária do mRNA, ou pode simplesmente se dissociar, frequentemente 20% ou menos dos clones em uma biblioteca de cDNA são DNA de comprimento total. Isso torna difícil o uso da biblioteca para mapear os sítios de início da transcrição (TSS) e para estudar a parte de um gene que codifica a sequência aminoterminal de uma proteína. Uma das várias abordagens desenvolvidas para superar esse problema está ilustrada na Figura Q-1. Esses refinamentos na tecnologia resultaram na criação de bibliotecas de cDNA em que mais de 95% dos clones têm comprimento total, fornecendo uma fonte enriquecida de informação acerca dos RNA celulares. Entretanto, os cDNA são geralmente criados a partir de transcritos de RNA que têm caudas poli(A). O uso de microarranjos, associado a métodos de preparação do cDNA que não dependam das caudas poli(A) (Figura Q-2), revelaram que maior parte do RNA em células eucariontes não apresenta as estruturas de terminação comuns.

Uma visão completa ainda não emergiu, mas algumas conclusões já são claras. Ao serem retiradas as sequências repetitivas (p. ex., transposons) que podem constituir

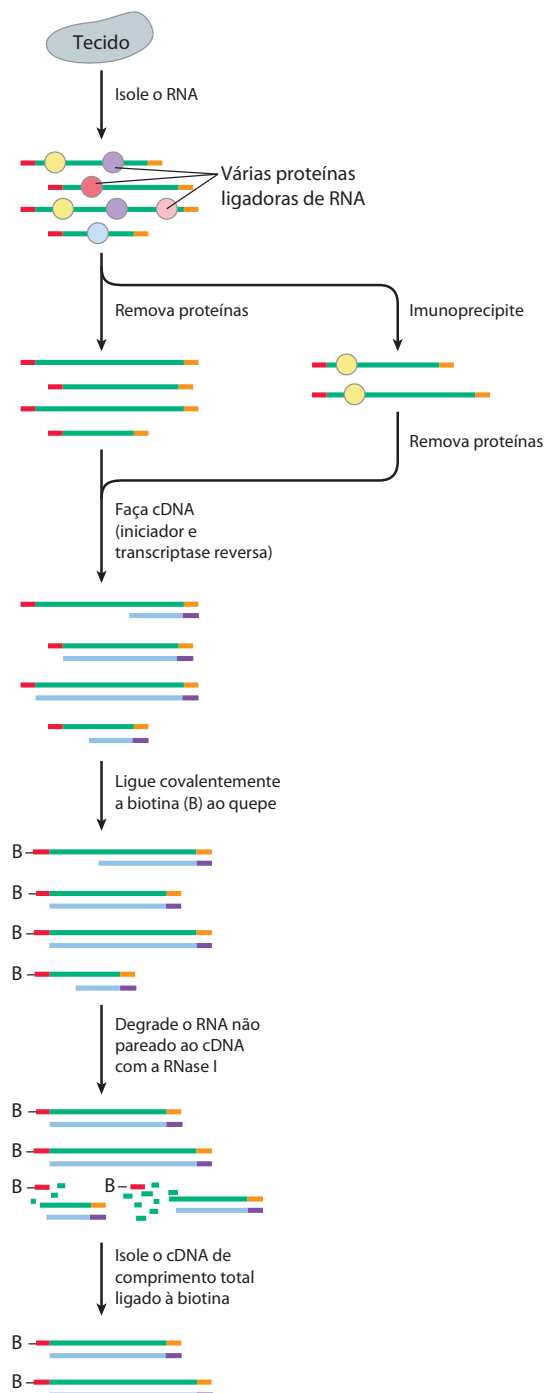



**FIGURA Q-1** Uma estratégia para clonar todos os cDNAs. Um conjunto de mRNAs é isolado de uma amostra de tecido. Em alguns casos, os mRNAs ligados por uma proteína em particular podem ser marcados imunoprecipitando a proteína e isolando os mRNAs associados. A biotina (B) é covalentemente ligada às extremidades 5′ fazendo uso das características únicas do quepe 5′. Um iniciador (roxo) poli(dT) é usado para disparar a transcrição reversa dos mRNAs. A RNase I degrada o RNA que não é parte de um híbrido de DNA-RNA e portanto destrói os pares incompletos cDNA-RNA. Os híbridos de comprimento total cDNA-RNA são coletados com contas de estreptavidina (que se ligam à biotina), convertidos em DNA duplex e clonados.

até metade do genoma de mamíferos, pelo menos 40% – e talvez a grande maioria – do DNA genômico restante é transcrita em RNA. Parece haver mais RNA sem caudas de poli(A) do que RNA com elas. A maior parte desse RNA não é transportada para o citoplasma, mas permanece exclusivamente no núcleo. Vários segmentos do genoma são transcritos em ambas as fitas; um transcrito é o complemento do outro, uma relação chamada de antissenso. Vários dos RNAs antissenso podem estar envolvidos na regulação dos RNAs com os quais eles pareiam. Muitos RNAs são produzidos em apenas um ou poucos tecidos e novos transcritos são descobertos toda vez que uma nova fonte de tecidos é analisada. Desse modo, o transcriptoma completo ainda não foi definido para qualquer organismo. O mais importante; muitos dos novos RNAs são transcritos a partir de segmentos genômicos, como aqueles ilustrados na Figura 9-15, que compartilham sintenia em mais de um organismo. Essa conservação evolutiva sugere fortemente que esses RNA têm uma importante função.

Alguns dos novos RNAs são snoRNAs, snRNAs ou miRNAs, tipos de RNAs descobertos apenas nas últimas duas décadas. Novas sequências TSS estão sendo descobertas. Novas classes de moléculas de RNA estão sendo definidas. Novos padrões de *splicing* alternativo estão sendo elucidados. E todas essas descobertas estão desafiando nossas definições de gene. Nos genomas de camundongos e humanos, mesmo os familiares transcritos de mRNAs codificadores de proteína podem ser muito mais numerosos do que inicialmente se pensava, e o número de genes conhecidos codificadores de proteínas pode em breve aumentar. Entretanto, a função da maioria desses transcritos recentemente descobertos não é conhecida e eles podem ser simplesmente chamados de TUF (transcritos de função desconhecida, *transcripts of unknown function*). Esse novo universo de RNA é uma fronteira que promete conhecimentos adicionais nas investigações de células eucariontes e talvez um novo olhar sobre nossas origens no mundo de RNA do passado distante.

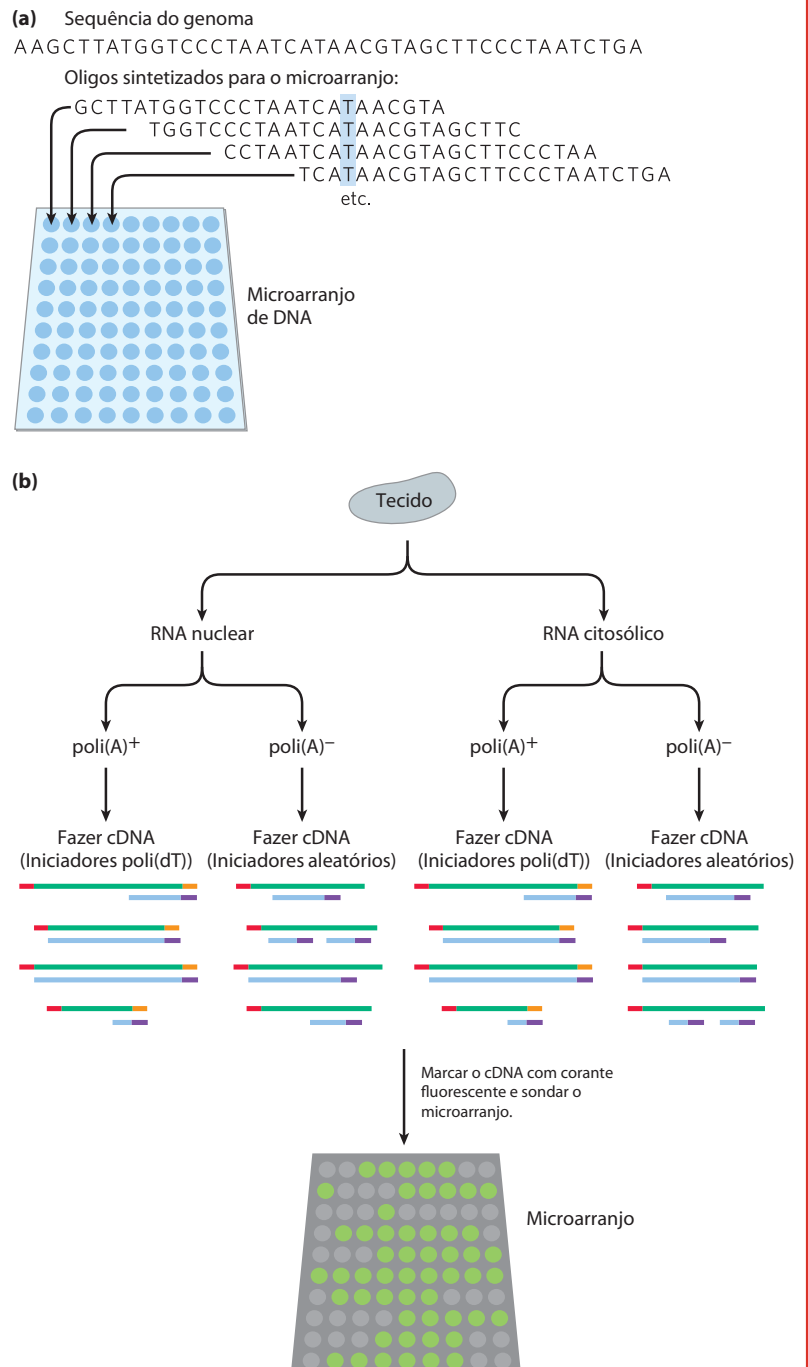



**FIGURA Q-2** Definindo o transcriptoma com microarranjos. **(a)** Blocos de microarranjos são sintetizados, representando as partes não repetitivas do genoma. Em um arranjo desse tipo, os oligonucleotídeos sucessivos nos pontos individuais se sobrepõem em sequência, de modo que cada nucleotídeo (como o T mostrado em azul) é representado múltiplas vezes. **(b)** Uma amostra de tecido é fracionada para separar amostras nucleares e citoplasmáticas e o RNA é isolado de cada uma delas. O RNA contendo caudas de poli(A) é separado do RNA sem as caudas (passando o RNA por uma coluna com poli(dT) ligado). O RNA com uma cauda de poli(A) é convertido em cDNA usando os métodos descritos na Figura Q-1. RNA que não possui uma cauda de poli(A) é convertido a cDNA usando iniciadores com sequências aleatórias. Os fragmentos de DNA resultantes não correspondem em comprimento precisamente aos RNAs dos quais eles se originaram, mas o conjunto geral de DNA inclui a maioria das sequências presentes nos RNAs originais. As amostras de cDNA são então marcadas e usadas para sondar os microarranjos. Os sinais dos microarranjos definem as sequências que foram transcritas em RNA.

## RESUMO 26.3 Síntese de RNA e DNA dependente de RNA

- As DNA-polimerases dependentes de RNA, também chamadas de transcriptases reversas, foram descobertas primeiro em retrovírus, que devem converter seus genomas de RNA em DNA de fita dupla como parte do seu ciclo vital. Essas enzimas transcrevem o RNA viral em DNA, um processo que pode ser usado experimentalmente para formar DNA complementar.
- Muitos transposons de eucariontes são relacionados a retrovírus e seu mecanismo de transposição inclui um RNA intermediário.
- Telomerase, a enzima que sintetiza as extremidades do telômero dos cromossomos lineares, é uma transcriptase reversa especializada que contém um molde interno de RNA.
- As RNA-polimerases dependentes de RNA, tais como as replicases dos bacteriófagos RNA, são específicas de molde para o RNA viral.
- A existência de RNA catalíticos e vias para a interconversão de RNA e DNA levou à especulação de que um importante estágio na evolução foi o aparecimento de um RNA (ou um polímero equivalente) que poderia catalisar sua própria replicação. O potencial bioquímico dos RNA pode ser explorado pelo SELEX, um método para selecionar rapidamente sequências de RNA com propriedades particulares ou catalíticas.

## Termos-chave

*Termos em negrito são definidos no glossário.*



## Leituras adicionais

### Geral

**Cox, M.M., Doudna, J.A., & O'Donnell, M.** (2012) *Molecular Biology: Principles and Practice,* W. H. Freeman and Company, New York.

**Jacob, F. & Monod, J.** (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **3**, 318–356.
Artigo clássico que introduziu muitas ideias importantes.

### Síntese de RNA guiada por DNA

**Gruber, T.M. & Gross, C.A.** (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 441–466.

**Herbert, K.M., Greenleaf, W.J., & Block, S.M.** (2008) Single-molecule studies of RNA polymerase: motoring along. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 149–176.

**Kuehner, J.N., Pearson, E.L., & Moore, C.** (2011) Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 283–294.

**Laine, J.P. & Egly, J.M.** (2006) When transcription and repair meet: a complex system. *Trends Genet.* **22**, 430–436.

**Mooney, R.A., Darst, S.A., & Landick, R.** (2005) Sigma and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship? *Mol. Cell* **20**, 335–345.

**Nudler, E.** (2009) RNA polymerase active center: the molecular engine of transcription. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 335–361.

**Svejstrup, J.Q., Conaway, R.C., & Conaway, J.W.** (2006) RNA polymerase II: a "Nobel" enzyme demystified. *Mol. Cell* **24**, 637–642.

**Thomas, M.C. & Chiang, C.M.** (2006) The general transcription machinery and general cofactors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 105–178.

**Zhou, Q., Li, T., & Price, D.H.** (2012) RNA polymerase II elongation control. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 119–143.

### Processamento de RNA

**Berezikov, E.** (2011) Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 846–860.

**Buchan, J.R. & Parker, R.** (2007) The two faces of miRNA. *Science* **318**, 1877–1878.

**Butcher, S.E. & Brow, D.A.** (2005) Towards understanding the catalytic core structure of the spliceosome. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 447–449.

**Gogarten, J.P. & Hilario, E.** (2006) Inteins, introns, and *homing* endonucleases: recent revelations about the life cycle of parasitic genetic elements. *BMC Evol. Biol.* **6**, 94.

**Hoskins, A.A., Gelles, J., & Moore, M.J.** (2011) New insights into the spliceosome by single molecule fluorescence microscopy. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 864–870.

**Huang, Y.Q. & Steitz, J.A.** (2005) SRprises along a messenger's journey. *Mol. Cell* **17**, 613-615.

**Kaberdin, V.R. & Blasi, U.** (2006) Translation initiation and the fate of bacterial mRNAs. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 967–979.

**Kalsotra, A. & Cooper, T.A.** (2011) Functional consequences of developmentally regulated alternative *splicing*. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 715–729.

**Reiter, N.J., Chan, C.W., & Mondragon, A.** (2011) Emerging structural themes in large RNA molecules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**, 319–326.

**Rodriguez-Trelles, F., Tarrio, R., & Ayala, F.J.** (2006) Origins and evolution of spliceosomal introns. *Annu. Rev. Genet.* **40**, 47–76.

**Schneider, D.A., Michel, A., Sikes, M.L., Vu, L., Dodd, J.A., Salgia, S., Osheim, Y.S., Beyer, A.L., & Nomura, M.** (2007) Transcription elongation by RNA polymerase I is linked to efficient rRNA processing and ribosome assembly. *Mol. Cell* **26**, 217–229.

### Síntese de RNA ou DNA guiada por RNA

**Blackburn, E.H., Greider, C.W., & Szostak, J.W.** (2006) Telomeres and telomerase: the path from maize, *Tetrahymena* and yeast to human cancer and aging. *Nat. Med.* **12**, 1133–1138.

**Boeke, J.D. & Devine, S.E.** (1998) Yeast retrotransposons: finding a nice, quiet neighborhood. *Cell* **93**, 1087–1089.

**Cordaux, R. & Batzer, M.A.** (2009) The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 691–703.

**Frankel, A.D. & Young, J.A.T.** (1998) HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 1–25.

**Mason, M., Schuller, A., & Skordalakes, E.** (2011) Telomerase structure function. *Curr Opin. Struct. Biol.* **21**, 92–100.

**O'Sullivan, R.J. & Karlseder, J.** (2010) Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 171–181.

**Temin, H.M.** (1976) The DNA provirus hypothesis: the establishment and implications of RNA-directed DNA synthesis. *Science* **192**, 1075–1080.

Discussão da proposta original para a transcrição reversa em retrovírus.

### Ribozimas e evolução

**Carninci, P.** (2007) Constructing the landscape of the mammalian genome. *J. Exp. Biol.* **210**, 1497–1506.

Um bom resumo da pesquisa mostrando que os transcriptomas de mamíferos são muito mais extensos do que pensado originalmente.

**Doudna, J.A. & Lorsch, J.R.** (2005) Ribozyme catalysis: not different, just worse. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 395–402.

**Green, R. & Doudna, J.A.** (2006) RNAs regulate biology. *ACS Chem. Biol.* **1**, 335–338.

**Huttenhofer, A. & Vogel, J.** (2006) Experimental approaches to identify noncoding RNAs. *Nucleic Acids Res.* **34**, 635–646.

**Joyce, G.F.** (2002) The antiquity of RNA-based evolution. *Nature* **418**, 214– 221.

**Kazantsev, A.V. & Pace, N.R.** (2006) Bacterial RNase P: a new view of an ancient enzyme. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 729–740.

**Lassila, J.K., Zalatan, J.G., & Herschlag, D.** (2011) Biological phosphoryltransfer reactions: understanding mechanism and catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 669–702.

**Lincoln, T.A. & Joyce, G.F.** (2009) Self-sustained replication of an RNA enzyme. *Science* **323**, 1229–1232.

**Müller, U.F.** (2006) Recreating an RNA world. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 1278–1293.

**Willingham, A.T. & Gingeras, T.R.** (2006) TUF love for "junk" DNA. *Cell* **125**, 1215–1220.

**Wilson, T.J. & Lilley, D.M.** (2009) The evolution of ribozyme chemistry. *Science* **323**, 1436–1438.

**Wochner, A., Attwater, J., Coulson, A., & Holliger, P.** (2011) Ribozymecatalyzed transcription of an active ribozyme. *Science* **332**, 209–212.

**Yarus, M.** (2002) Primordial genetics: phenotype of the ribocyte. *Annu. Rev. Genet.* **36**, 125-151.

Especulações detalhadas sobre como pode ter sido uma forma de vida baseada em RNA e um bom resumo da pesquisa por trás delas.

## Problemas

**1. RNA-polimerase.** (a) Quanto tempo demoraria para a RNA-polimerase da *E. coli* sintetizar o transcrito primário dos genes de *E. coli* que codificam as enzimas para o metabolismo da lactose (o óperon *lac* de 5.300 pb, considerado no Capítulo 28)? (b) Quanto se move ao longo do DNA a "bolha" formada pela RNA-polimerase em 10 segundos?

**2. Erro de conexão por RNA-polimerases.** As DNA-polimerases são capazes de edição e correção de erros, enquanto a capacidade de correção de erros nas RNA-polimerases parece ser bastante limitada. Uma vez que um erro de uma única base na replicação ou transcrição pode levar a um erro na síntese proteica, sugira uma explicação biológica possível para essa diferença.

**3. Processamento do RNA pós-transcricional.** Prevê os prováveis efeitos de uma mutação na sequência (5′)AAUAAA no transcrito de um mRNA de eucariontes.

**4. Fita codificadora *versus* fita-molde.** O genoma do RNA do fago Q$\beta$ é a fita não molde, ou fita codificadora, e quando introduzido na célula, funciona como um mRNA. Suponha que a RNA-replicase do fago Q$\beta$ tenha sintetizado primariamente uma fita-molde de RNA e singularmente a incorporado, em vez de fitas não molde, nas partículas virais. Qual seria o destino das fitas-molde quando elas entram em uma nova célula? Que enzima teria que ser incluída nas partículas virais para uma invasão bem-sucedida de uma célula hospedeira?

**5. Transcrição.** O gene codificando a enzima $\beta$ galactosidase de *E. coli* se inicia com a sequência ATGACCATGATTACG. Qual é a sequência do transcrito de RNA especificado por essa parte do gene?

**6. A química da biossíntese de ácidos nucleicos.** Descreva três propriedades comuns às reações catalisadas pela DNA-polimerase, RNA-polimerase, transcriptase reversa e RNA-replicase. Como a enzima polinucleotídeo-fosforilase é semelhante e diferente de cada uma dessas quatro enzimas?

**7. *Splicing* de RNA.** Qual é o número mínimo de reações de transesterificação necessárias para realizar *splicing* de um íntron a partir de um transcrito de mRNA? Explique.

**8. Processamento de RNA.** Se o *splicing* de mRNA em uma célula de vertebrado é bloqueado, as reações de modificação do rRNA também são bloqueadas. Sugira uma razão para isso.

**9. Genomas de RNA.** Os vírus de RNA têm genomas relativamente pequenos. Por exemplo, os RNA de fita simples de retrovírus têm cerca de 10.000 nucleotídeos, e o RNA Q$\beta$ tem apenas 4.220 nucleotídeos de comprimento. Dadas as propriedades da transcriptase reversa e da RNA replicase descritas nesse capítulo, você pode sugerir uma razão para o tamanho pequeno desses genomas virais?

**10. Rastreamento de RNA por SELEX.** O limite prático para o número de diferentes sequências de RNA que pode ser rastreado em um experimento SELEX é de $10^{15}$. (a) Suponha que você está trabalhando com oligonucleotídeos de 32 nucleotídeos de comprimento. Quantas sequências existem em um conjunto aleatório contando cada sequência possível? (b) Que percentual dessas pode ser rastreado em um experimento SELEX? (c) Suponha que você deseja selecionar uma molécula de RNA que catalisa a hidrólise de um éster em particular. A partir do que você sabe sobre catálise, proponha uma estratégia SELEX que possa lhe permitir selecionar o catalisador apropriado.

**11. Morte lenta.** O cogumelo mortal, *Amanita phalloides*, contém várias substâncias perigosas, incluindo a letal $\alpha$-amanitina. Essa toxina bloqueia o alongamento do RNA em consumidores do cogumelo ao se ligar à RNA-polimerase II de eucariontes com muita afinidade; ela é mortal em concentrações tão baixas quanto $10^{-8}$ M. A reação inicial à ingestão do cogumelo é a de distúrbio gastrintestinal (causado por algumas outras toxinas). Esses sintomas desaparecem, mas cerca de 48hs depois, o consumidor de cogumelos morre, geralmente de disfunção hepática. Especule sobre por que demora tanto tempo para a $\alpha$-amanitina matá-lo.

**12. Detecção de linhagens de tuberculose resistentes à rifampicina.** A rifampicina é um importante antibiótico usado para tratar a tuberculose e outras doenças micobacterianas. Algumas linhagens de *Mycobacterium tuberculosis*, o agente causador da tuberculose, são resistentes à rifampicina. Essas linhagens se tornam resistentes por meio de mutações que alteram o gene *rpoB*, que codifica a subunidade $\beta$ da RNA-polimerase. Rifampicina não pode se ligar à RNA-polimerase mutante e assim não é capaz de bloquear a iniciação da transcrição. As sequências de DNA de um grande número de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina apresentaram mutações em uma região específica de 69 pb do *rpoB*. Uma linhagem resistente à rifampicina bem caracterizada tem a alteração de um único par de bases no *rpoB* que resulta na substituição de um resíduo de His por um resíduos de Asp na subunidade $\beta$.

(a) Com base no seu conhecimento da química de proteínas, sugira uma técnica que permita a detecção de uma linhagem resistente à rifampicina contendo essa proteína mutante específica.

(b) Com base no seu conhecimento da química de ácidos nucleicos, sugira uma técnica para identificar a forma mutante do *rpoB*.

## Bioquímica na internet

**13. O gene da ribonuclease.** A ribonuclease pancreática humana tem 128 resíduos de aminoácidos.

(a) Qual é o número mínimo de pares de nucleotídeos necessários para codificar essa proteína?

(b) O mRNA expressado em células pancreáticas humanas foi copiado com a transcriptase reversa para criar uma "biblioteca" de DNA humano. A sequência do mRNA que codifica a ribonuclease pancreática humana foi determinada pelo sequenciamento do DNA complementar (cDNA) a partir dessa biblioteca que incluiu uma fase de leitura aberta para essa proteína. Use o sistema de banco de dados Entrez (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) para encontrar a sequência publicada desse mRNA (procure no banco de dados CoreNucleotide pelo número de acesso D26129). Qual é o comprimento desse mRNA?

(c) Como você pode explicar a discrepância entre o tamanho que você calculou em (a) e o tamanho real do mRNA?

## Problema de análise de dados

**14. O caso da edição do RNA.** O receptor AMPA (ácido $\alpha$-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolepropiônico) é um componente importante do sistema nervoso humano. Ele está presente de várias formas, em diferentes neurônios, e parte dessa variedade resulta de modificação pós-transcricional. Esse problema explora a pesquisa no mecanismo de edição do RNA.

Um relato inicial de Sommer e coautores (1991) abordou a sequência que codifica um resíduo-chave de Arg no receptor AMPA. A sequência do cDNA (ver Figura 9-14) para o receptor AMPA mostrou um códon CGG (Arg; ver Figura 27-7) para esse aminoácido. De maneira surpreendente, o DNA genômico mostrou um códon CAG (Gln) nessa posição.

(a) Explique como esse resultado é consistente com a modificação pós-transcricional do mRNA do receptor AMPA.

Rueter e colaboradores (1995) investigaram esse mecanismo detalhadamente. Primeiro, eles desenvolveram um ensaio com base no método de sequenciamento de DNA de Sanger para diferenciar entre transcritos editados e não editados (ver Figura 8-33). Eles modificaram a técnica para determinar se a base em questão era um A (como em CAG) ou não. Eles designaram dois iniciadores de DNA com base na sequência genômica do DNA dessa região do gene AMPA. Esses iniciadores e a sequência de DNA genômico da fita não molde para a região relevante do gene receptor do AMPA são mostrados ao final da página; o resíduo A editado está em vermelho.

A fim de detectar se esse A estava presente ou foi editado por outra base, Rueter e colaboradores usaram o seguinte procedimento:

1. Prepararam cDNA complementar ao mRNA, usando iniciador 1, transcriptase reversa, dATP, dGTP, dCTP e dTTP.
2. Removeram o mRNA.
3. Hibridizaram o iniciador 2 marcado com $^{32}P$ com o cDNA, e reagiram isso com DNA-polimerase, dGTP, dCTP, dTTP e ddATP (didesóxi ATP; ver Figura 8-33).
4. Desnaturaram os duplexes resultantes e os separaram com eletroforese em gel de poliacrilamida (ver Figura 3-18).
5. Detectaram espécies de DNA marcado com $^{32}P$ por meio da autorradiografia.

Eles descobriram que o mRNA editado produziu um DNA[$^{32}P$] de 22 nucleotídeos, enquanto um mRNA não editado produziu um DNA[$^{32}P$] de 19 nucleotídeos.

(b) Usando as sequências a seguir, explique como os mRNA editados e não editados resultaram nesses diferentes produtos.

Usando o mesmo procedimento para medir a fração de transcritos editada sob diferentes condições, os pesquisado-

(5′) ...GTCTCTGGTTTTCCTTGGGTGCCTTTATGCAGCAAGGATGCGATATTTCGCCAAG...
Oligonucleotídeo iniciador 1: CGTTCCTACGCTATAAAGCGGTTC (5′)
Oligonucleotídeo iniciador 2: (5′) CCTTGGGTGCCTTTA

res descobriram que extratos de células epiteliais em cultura (uma linhagem celular comum chamada HeLa) poderiam editar o mRNA em um nível superior. A fim de determinar a natureza do maquinário de edição, eles pré-trataram um extrato celular ativo HeLa como descrito na tabela e mediram sua capacidade de editar mRNA AMPA. A proteinase K degrada apenas proteínas; a nuclease de micrococos, apenas DNA.

| Amostra | Pré-tratamento | % mRNA editado |
|---|---|---|
| 1 | Nenhum | 18 |
| 2 | Proteinase K | 5 |
| 3 | Aquecimento a 65°C | 3 |
| 4 | Aquecimento a 85°C | 3 |
| 5 | Nuclease de micrococos | 17 |

(c) Use esses dados para argumentar que a máquina de edição consiste em proteína. Qual é uma fragilidade importante nesse argumento?

Para determinar a natureza exata da base editada, Rueter e colaboradores usaram o seguinte procedimento:

1. Produziram mRNA, usando [$\alpha$-$^{32}$P]ATP na mistura de reação.
2. Editaram o mRNA marcado pela incubação do extrato HeLa.
3. Hidrolisaram o mRNA editado em nucleotídeos monofosfatos isolados com a nuclease P1.
4. Separaram os nucleotídeos monofosfatos com cromatografia de camada fina (TLC; ver Figura 10-25b).
5. Identificaram com autorradiografia os nucleotídeos monofosfatos resultantes marcados com $^{32}$P.

Em mRNA não editado, encontraram apenas [$^{32}$P]AMP; em mRNA editado encontraram principalmente [$^{32}$P]AMP com alguns [$^{32}$P]IMP (inosina monofosfato; ver Figura 22-36).

(d) Por que foi necessário usar [$\alpha$-$^{32}$P]ATP em vez de [$\beta$-$^{32}$P]ATP ou [$\gamma$-$^{32}$P]ATP nesse experimento?

(e) Por que foi necessário usar [$\alpha$-$^{32}$P]ATP em vez de [$\alpha$-$^{32}$P]GTP, [$\alpha$-$^{32}$P]CTP, ou [$\alpha$-$^{32}$P]UTP?

(f) Como o resultado exclui a possibilidade que todo o nucleotídeo A (açúcar, base e fosfato) foi removido e substituído por um nucleotídeo I durante o processo de edição?

Em seguida, os pesquisadores editaram o mRNA que foi marcado com [2,8-$^{3}$H]ATP e repetiram o procedimento acima. Os únicos mononucleotídeos produzidos marcados com $^{3}$H foram o AMP e o IMP.

(g) Como esse resultado exclui a remoção da base A (deixando intacto o esqueleto de açúcar-fosfato) seguido pela substituição com uma base I como mecanismo de edição? Qual, então, é o mecanismo mais provável de edição nesse caso?

(h) Como a mudança de um A para um resíduo I no mRNA explica uma alteração de Gln para Arg na sequência de proteínas nas duas formas da proteína receptora AMPA? (Dica: ver Figura 27-8.).

### Referências

**Rueter, S.M., Burns, C.M., Coode, S.A., Mookherjee, P., & Emesont, R.B.** (1995) Glutamate receptor RNA editing in vitro by enzymatic conversion of adenosine to inosine. *Science* **267**, 1491–1494.

**Sommer, B., Köhler, M., Sprengel, R., & Seeburg, P.H.** (1991) RNA editing in brain controls a determinant of íon flow in glutamate-gated channels. *Cell* **67**, 11–19.

# 27

# Metabolismo das Proteínas



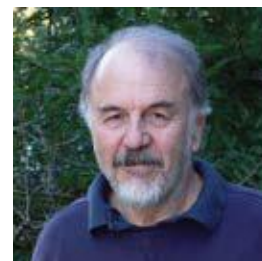
As proteínas são os produtos finais da maioria das vias de informação. A toda hora, uma célula típica requer milhares de proteínas diferentes, as quais precisam ser sintetizadas em resposta às necessidades da célula naquele momento, transportadas (direcionadas) para seus locais apropriados na célula e degradadas quando não mais se fizerem necessárias. Muitos dos componentes e mecanismos básicos utilizados pela maquinaria de síntese proteica são notavelmente bem conservados em todas as formas de vida, de bactérias a eucariotos, o que indica que esses componentes e mecanismos já estavam presentes no último ancestral comum universal de todos os organismos existentes hoje (LUCA, de *last universal common ancestor*).

A compreensão da síntese de proteínas, o mais complexo processo de biossíntese, tem sido um dos maiores desafios da bioquímica. A síntese proteica em eucariotos envolve mais de 70 proteínas ribossomais diferentes; 20 ou mais enzimas para ativar os precursores de aminoácidos; uma dúzia ou mais de enzimas auxiliares e outros fatores proteicos para as etapas de iniciação, alongamento e término de polipeptídeos; talvez 100 enzimas adicionais para o processamento final das diferentes proteínas, e 40 ou mais tipos de RNAs transportadores e ribossomais. Ao todo, quase 300 macromoléculas diferentes cooperam para a síntese de polipeptídeos. Muitas dessas macromoléculas estão organizadas dentro da complexa estrutura tridimensional do ribossomo.

Para se ter uma ideia do quanto a síntese de proteínas é importante para a célula, considere os recursos celulares destinados a esse processo. A síntese proteica chega a consumir 90% do total de energia utilizada por uma célula para reações biossintéticas. Todas as células de bactérias, arquibactérias e eucariotos contêm de algumas a milhares de cópias de diferentes proteínas e RNAs. Os 15.000 ribossomos, 100.000 moléculas de enzimas e fatores proteicos envolvidos na síntese de proteínas e 200.000 moléculas de tRNA em uma célula bacteriana típica correspondem a mais de 35% do peso seco da célula.

Apesar da grande complexidade do processo de síntese proteica, as proteínas são produzidas de forma extraordinariamente rápida. Um polipeptídeo de 100 resíduos de aminoácidos é sintetizado em uma célula de *Escherichia coli* (a 37°C) em cerca de 5 segundos. A síntese de milhares de proteínas diferentes em uma célula é firmemente regulada, de modo que as cópias são feitas apenas em números suficientes para suprir as necessidades metabólicas daquele dado momento. Para manter a combinação e as concentrações apropriadas de proteínas, os processos de endereçamento e degradação devem estar sincronizados com o de síntese. As pesquisas estão, gradativamente, descobrindo a finamente coordenada coreografia celular que guia cada proteína para seu local apropriado na célula e que degrada essa proteína seletivamente quando ela não é mais necessária.

Harry Noller

O estudo da síntese de proteínas oferece outra recompensa importante: uma visão de um mundo de catalisadores de RNA que pode ter existido antes do início da vida "como a conhecemos". A elucidação sobre a estrutura tridimensional dos ribossomos, que teve início no ano 2000, tem nos proporcionado uma visão cada vez mais detalhada dos mecanismos de síntese proteica. Também confirmou uma hipótese que havia sido levantada primeiramente por Harry Noller duas décadas atrás: as proteínas são sintetizadas por uma gigantesca enzima formada por RNA!

## 27.1 O código genético

Três grandes avanços estabeleceram o cenário para o nosso atual conhecimento sobre a biossíntese de proteínas. Primeiro, no início da década de 1950, Paul Zamecnik e colaboradores planejaram uma série de experimentos para investigar onde as proteínas são sintetizadas na célula. Eles injetaram aminoácidos radioativos em ratos e, a intervalos diferentes de tempo após a injeção, retiraram o fígado, homogeneizaram-no, fracionaram o material homogeneizado por centrifugação e examinaram a presença de proteína radioativa nas frações subcelulares. Quando se decorriam horas ou dias após a injeção dos aminoácidos marcados, *todas* as frações subcelulares continham proteínas marcadas. Por outro lado, quando se deixava passar apenas alguns minutos, as proteínas marcadas apareciam somente em uma fração contendo pequenas partículas de ribonucleoproteínas. Essas partículas, visíveis nos tecidos animais por

Paul Zamecnik, 1912–2009

microscopia eletrônica, foram então identificadas como o local da síntese de proteínas a partir dos aminoácidos e, mais tarde, foram denominadas ribossomos (**Figura 27-1**).

O segundo avanço-chave foi feito por Mahlon Hoagland e Zamecnik, quando eles descobriram que os aminoácidos eram "ativados" quando incubados com ATP e com a fração citosólica das células hepáticas. Os aminoácidos se ligavam a um RNA termoestável solúvel do tipo que havia sido descoberto e caracterizado por Robert Holley e mais tarde denominado RNA transportador (tRNA), para formar **aminoacil-tRNA**. As enzimas que catalisam esse processo são as **aminoacil--tRNA-sintases**.

O terceiro avanço resultou dos argumentos de Francis Crick acerca de como a informação genética codificada na linguagem de 4 letras dos ácidos nucleicos era capaz de ser traduzida na linguagem de 20 letras das proteínas. Um pequeno ácido nucleico (talvez RNA) poderia ter o papel de um adaptador, e uma parte da molécula adaptadora ligaria um aminoácido específico, enquanto outra parte reconheceria a sequência nucleotídica que codifica aquele aminoácido no mRNA (**Figura 27-2**). Essa ideia foi logo verificada. O tRNA adaptador "traduz" a sequência nucleotídica de um mRNA na sequência de aminoácidos de um polipeptídeo. O processo geral da síntese proteica dirigida por mRNA é com frequência chamado simplesmente de **tradução**.

Esses três avanços logo levaram à identificação das três etapas principais da síntese proteica e, finalmente, à elucidação do código genético que especifica cada aminoácido.

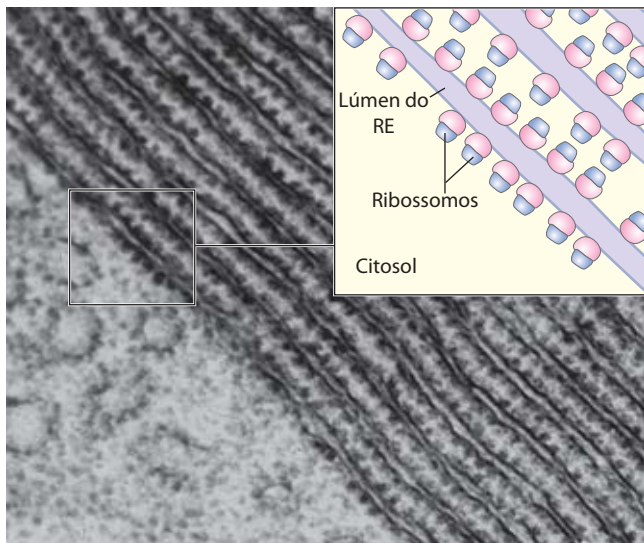



**FIGURA 27-1 Ribossomos e retículo endoplasmático.** Micrografia eletrônica e desenho esquemático de uma porção de uma célula pancreática, mostrando os ribossomos aderidos à superfície externa (citosólica) do retículo endoplasmático (RE). Os ribossomos são os numerosos pontos ao longo das camadas paralelas de membrana.

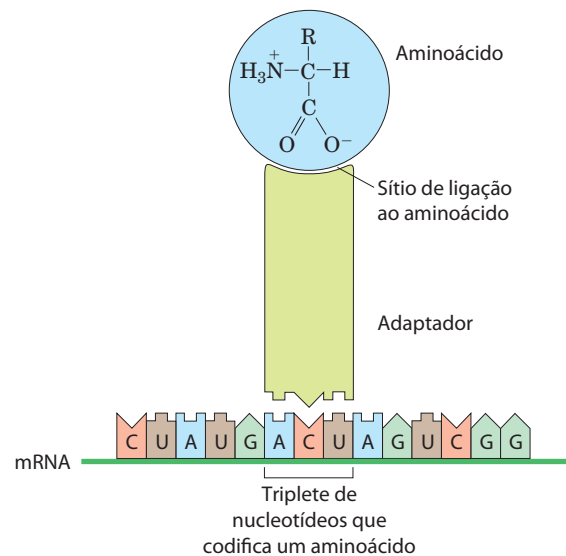



**FIGURA 27-2 A hipótese de um adaptador proposta por Crick.** Hoje, sabe-se que o aminoácido está ligado covalentemente à extremidade 3′ de uma molécula de tRNA e que um triplete de nucleotídeos específico em outra parte do tRNA interage com um códon triplete específico do mRNA por meio de ligações de hidrogênio entre bases complementares.

## O código genético foi decifrado utilizando-se moldes artificiais de mRNA

Por volta da década de 1960, já era evidente que pelo menos três resíduos de nucleotídeos no DNA eram necessários para codificar cada aminoácido. As quatro letras do código de DNA (A, T, G e C), em grupos de dois, podem gerar apenas $4^2 = 16$ combinações diferentes, o que é insuficiente para codificar 20 aminoácidos. Grupos de três, no entanto, geram $4^3 = 64$ combinações diferentes.

Várias propriedades-chave do código genético foram estabelecidas nos primeiros estudos genéticos (**Figuras 27-3** e **27-4**). Um **códon** é um triplete de nucleotídeos que codifica um aminoácido específico. A tradução ocorre de forma

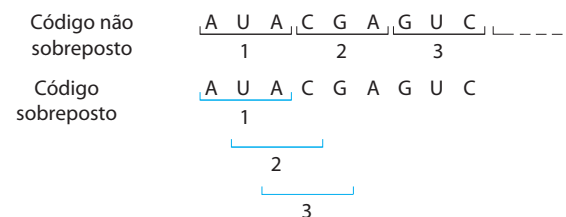



**FIGURA 27-3 Códigos genéticos com e sem sobreposição.** Em um código sem sobreposição, os códons (enumerados consecutivamente) não compartilham nucleotídeos. Em um código com sobreposição, alguns nucleotídeos no mRNA são compartilhados por diferentes códons. Em um código triplete com sobreposição máxima, muitos nucleotídeos, como, por exemplo, o terceiro nucleotídeo da esquerda para a direita (A), são compartilhados por três códons. Observe que, em um código com sobreposição, a sequência triplete do primeiro códon limita as possíveis sequências para o segundo códon. Um código sem sobreposição permite muito maior flexibilidade para as sequências tripletes dos códons vizinhos e, portanto, para as possíveis sequências de aminoácidos designadas pelo código. Hoje, sabe-se que o código genético utilizado por todos os sistemas vivos é sem sobreposição.

**FIGURA 27-4 O código sem sobreposição em triplete.** As evidências para a natureza geral do código genético vieram de muitos tipos de experimentos, incluindo experimentos genéticos acerca de efeitos das mutações por deleção* e por inserção. Inserir ou deletar um par de bases (mostrados aqui no transcrito de mRNA) altera a sequência de tripletes em um código sem sobreposição; todos os aminoácidos codificados pelo mRNA após a mudança são afetados. A combinação de mutações por inserção e por deleção afeta alguns aminoácidos, mas pode, no final, restabelecer a sequência correta de aminoácidos. A adição ou remoção de três aminoácidos (não mostrado) mantém os demais tripletes intactos, evidenciando que o códon é constituído por três, e não quatro ou cinco, nucleotídeos. Os códons tripletes sombreados em cinza são aqueles traduzidos a partir do gene original; os códons mostrados em azul são novos códons resultantes de mutações por inserção ou deleção.

* N. de T. Deleção, do inglês *deletion*, ou deletar (do inglês *delete*, palavras por sua vez derivadas do latim *deletum*, destruir, apagar) são termos utilizados em genética e biologia molecular para designar a remoção de um nucleotídeo, de um aminoácido ou mesmo de um gene. Também pode ser utilizado o termo supressão.

tal que esses tripletes de nucleotídeos são lidos de maneira sucessiva e sem sobreposição. Um primeiro códon específico na sequência estabelece a **fase de leitura**, na qual, a cada três resíduos de nucleotídeos, inicia-se um novo códon. Não há interrupção entre os códons para os resíduos de aminoácidos sucessivos. A sequência de aminoácidos de uma proteína é definida por uma sequência linear de tripletes contíguos. A princípio, qualquer sequência de DNA fita simples ou mRNA tem três fases de leitura possíveis. Cada fase de leitura apresenta uma sequência diferente de códons (**Figura 27-5**), mas apenas uma deverá codificar uma dada proteína. Ainda restava uma questão-chave: quais eram as palavras de três letras em código para cada aminoácido?

Marshall Nirenberg, 1927-2010

Em 1961, Marshall Nirenberg e Heinrich Matthaei relataram a primeira grande descoberta nesse sentido. Eles incubaram poliuridilato sintético, poli(U), com um extrato de *E. coli*, GTP, ATP e uma mistura dos 20 aminoácidos em 20 tubos diferentes, cada um contendo um dos aminoácidos marcado radioativamente. Como o mRNA poli(U) é constituído por muitos tripletes UUU sucessivos, ele deveria codificar a síntese de um polipeptídeo contendo apenas o aminoácido codificado por UUU. De fato, um polipeptídeo radioativo foi formado em apenas um dos 20 tubos, aquele contendo fenilalanina radioativa. Assim, Nirenberg e Matthaei concluíram que o códon UUU codifica a fenilalanina. A mesma abordagem logo mostrou que policitidilato, poli(C), codifica um polipeptídeo contendo apenas prolina (poliprolina), e poliadenilato, poli(A), codifica polilisina. Poliguanilato não deu origem a qualquer polipeptídeo nesse experimento porque forma, espontaneamente, tétrades (ver Figura 8-20d) que não se ligam nos ribossomos.

Os polinucleotídeos sintéticos utilizados nesse experimento foram preparados com a polinucleotídeo-fosforilase (p. 1085), que catalisa a formação de polímeros de RNA a partir de ADP, UDP, CDP e GDP. Essa enzima, descoberta por Severo Ochoa, não necessita de molde e forma polímeros com uma composição de bases que reflete diretamente as concentrações relativas dos precursores, os nucleosídeos 5′-difosfatos presentes no meio. Se a polinucleotídeo-fosforilase for colocada em meio contendo apenas UDP, ela formará apenas poli(U). Se estiver presente uma mistura contendo 5 partes de ADP e uma parte de CDP, ela formará um polímero no qual cerca de cinco sextos dos resíduos são adenilato e um sexto é citidilato. Esse polímero aleatório provavelmente terá muitos tripletes com a sequência AAA, números menores de tripletes AAC, ACA e CAA, relativamente menos tripletes ACC, CCA e CAC, e muito poucos tripletes CCC (Tabela 27-1). Utilizando uma variedade de mRNA artificiais sintetizados pela polinucleotídeo-fosforilase a partir de diferentes misturas de ADP, GDP, UDP e CDP, os grupos de Nirenberg e de Ochoa logo identificaram as composições de bases dos tripletes que codificam quase todos os aminoácidos. Apesar de esses experimentos revelarem a composição de bases dos tripletes codificadores, eles não foram capazes de revelar a sequência das bases.

**CONVENÇÃO-CHAVE:** Grande parte da discussão que se segue trata de tRNA. O aminoácido especificado por um tRNA é indicado por um sobrescrito, como o $tRNA^{Ala}$, e o tRNA aminoacilado é indicado por um nome com hífen: alanil-$tRNA^{Ala}$ ou Ala-$tRNA^{Ala}$. ■

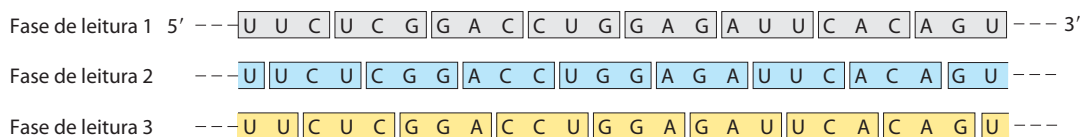



**FIGURA 27-5 Quadros de leitura no código genético.** Em um código sem sobreposição em triplete, todos os mRNA têm três fases de leitura possíveis, mostradas aqui em cores diferentes. Os tripletes, e consequentemente os aminoácidos codificados, são diferentes em cada fase de leitura.

**TABELA 27-1** Incorporação de aminoácidos em polipeptídeos em resposta a polímeros aleatórios de RNA

| Aminoácido | Frequência de incorporação observada (Lys = 100) | Indicação da tentativa da composição de nucleotídeos do códon correspondente* | Frequência esperada de incorporação com base na atribuição (Lys = 100) |
|---|---|---|---|
| Asparagina | 24 | $A_2C$ | 20 |
| Glutamina | 24 | $A_2C$ | 20 |
| Histidina | 6 | $AC_2$ | 4 |
| Lisina | 100 | AAA | 100 |
| Prolina | 7 | $AC_2$, CCC | 4,8 |
| Treonina | 26 | $A_2C$, $AC_2$ | 24 |

**Nota:** Aqui é apresentado um resumo dos dados de uma parte dos primeiros experimentos planejados para elucidar o código genético. Um RNA sintético contendo apenas resíduos A e C em uma proporção de 5:1 direcionou a síntese de polipeptídeos, e tanto a identidade como a quantidade de aminoácidos incorporados foram determinadas. Com base nas abundâncias relativas de resíduos A e C no RNA sintético, e atribuindo ao códon AAA (o códon mais provável) a frequência de 100, deveria haver três códons diferentes com a composição $A_2C$, cada qual com frequência relativa de 20; três com a composição $AC_2$, cada qual com frequência relativa de 4, e CCC com frequência relativa de 0,8. A indicação de CCC foi com base na informação obtida de estudos anteriores com poli(C). Quando duas indicações tentativas são feitas, propõe-se que ambas codificam o mesmo aminoácido.
*Essas indicações da composição de nucleotídeos não contêm informação sobre a sequência nucleotídica (exceto, claro, AAA e CCC).

Em 1964, Nirenberg e Philip Leder chegaram a outra grande descoberta experimental. Ribossomos isolados de *E. coli* se ligam a um aminoacil-tRNA específico na presença do polinucleotídeo mensageiro correspondente. Por exemplo, ribossomos incubados com poli(U) e fenilalanil-$tRNA^{Phe}$ ($Phe\text{-}tRNA^{Phe}$) se ligam a ambos os RNAs, mas, se incubados com poli(U) e algum outro aminoacil-tRNA, o aminoacil--tRNA não é ligado, porque não reconhece os tripletes UUU no poli(U) (Tabela 27-2). Mesmo trinucleotídeos eram capazes de promover a ligação específica de tRNA apropriados; portanto, esses experimentos podiam ser realizados com pequenos oligonucleotídeos sintetizados artificialmente. Com essa técnica, os pesquisadores determinaram quais aminoacil-tRNA se ligavam a 54 dos 64 códons possíveis. Para alguns códons, ou nenhum ou mais de um aminoacil--tRNA poderiam ligar-se. Outro método era necessário para completar e confirmar o código genético inteiro.

Por volta dessa época, uma abordagem complementar foi fornecida por H. Gobind Khorana, que desenvolveu métodos químicos para sintetizar polirribonucleotídeos com sequências repetidas de duas a quatro bases definidas. Os polipeptídeos produzidos a partir desses mRNA possuíam

H. Gobind Khorana
1922-2011

um ou poucos aminoácidos em padrões repetidos. Esses padrões, quando combinados com as informações obtidas a partir dos polímeros aleatórios utilizados por Nirenberg e colaboradores, permitiram designações não ambíguas para os códons. O copolímero $(AC)_n$, por exemplo, tem códons alternados ACA e CAC: ACACACACACACACA. O polipeptídeo sintetizado a partir desse mensageiro continha quantidades iguais de treonina e histidina. Considerando-se que um códon de histidina tem um A e dois C (Tabela 27-1), CAC deve codificar histidina e ACA treonina.

A consolidação dos resultados de muitos experimentos permitiu a determinação dos aminoácidos codificados por 61 dos 64 códons possíveis. Os outros três foram identificados como códons de parada, em parte porque eles interrompiam os padrões de codificação de aminoácidos quando apareciam em um polímero sintético de RNA (**Figura 27-6**). Em 1966, já haviam sido estabelecidos os significados para todas as trincas de códons (organizados no quadro da **Figura 27-7**), as quais foram verificadas por meio de muitas maneiras diferentes. A decifração do código genético é tida como uma das mais importantes descobertas científicas do século XX.

Os códons são a chave para a tradução da informação genética, direcionando a síntese de proteínas específicas. A fase de leitura é estabelecida quando a tradução de uma molécula de mRNA é iniciada e é mantida à medida que a maquinaria de síntese vai lendo a mensagem sequencialmente, de um triplete para outro. Se a fase de leitura inicial estiver com uma ou duas bases desalinhadas, ou se a tradução, de alguma forma, pular um nucleotídeo no mRNA, todos os códons subsequentes ficarão fora de registro; o resultado, geralmente, é uma proteína "errada" com uma sequência de aminoácidos distorcida.

**TABELA 27-2** Trinucleotídeos que induzem a ligação específica de aminoacil-tRNA aos ribossomos

| Trinucleotídeo | Aumento relativo da ligação ao ribossomo de aminoacil-tRNA marcado com $^{14}C$* | | |
|---|---|---|---|
| | $Phe\text{-}tRNA^{Phe}$ | $Lys\text{-}tRNA^{Lys}$ | $Pro\text{-}tRNA^{Pro}$ |
| UUU | 4,6 | 0 | 0 |
| AAA | 0 | 7,7 | 0 |
| CCC | 0 | 0 | 3,1 |

**Fonte:** Modificada de Nirenberg, M. & Leder, P. (1964) RNA code words and protein synthesis. *Science* **145**, 1399.
*Cada número representa o fator de aumento da quantidade de $^{14}C$ ligado quando o trinucleotídeo indicado estava presente, em relação ao controle sem trinucleotídeo.

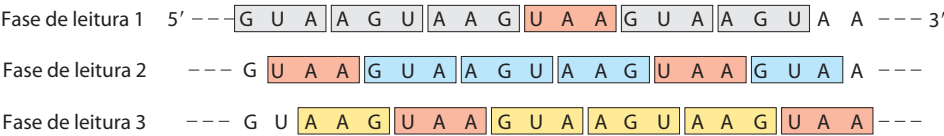



**FIGURA 27-6 Efeito de um códon de parada em um tetranucleotídeo repetitivo.** Códons de parada (cor salmão) são encontrados em cada quarto códon em três janelas de leitura diferentes (mostradas em cores diferentes). Dipeptídeos ou tripeptídeos são sintetizados, dependendo de onde o ribossomo se ligar inicialmente.

Primeira letra do códon (extremidade 5′)

Segunda letra do códon

| | U | | C | | A | | G | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| U | UU**U** | Phe | UC**U** | Ser | UA**U** | Tyr | UG**U** | Cys |
| | UU**C** | Phe | UC**C** | Ser | UA**C** | Tyr | UG**C** | Cys |
| | UU**A** | Leu | UC**A** | Ser | UA**A** | Parada | UG**A** | Parada |
| | UU**G** | Leu | UC**G** | Ser | UA**G** | Parada | UG**G** | Trp |
| C | CU**U** | Leu | CC**U** | Pro | CA**U** | His | CG**U** | Arg |
| | CU**C** | Leu | CC**C** | Pro | CA**C** | His | CG**C** | Arg |
| | CU**A** | Leu | CC**A** | Pro | CA**A** | Gln | CG**A** | Arg |
| | CU**G** | Leu | CC**G** | Pro | CA**G** | Gln | CG**G** | Arg |
| A | AU**U** | Ile | AC**U** | Thr | AA**U** | Asn | AG**U** | Ser |
| | AU**C** | Ile | AC**C** | Thr | AA**C** | Asn | AG**C** | Ser |
| | AU**A** | Ile | AC**A** | Thr | AA**A** | Lys | AG**A** | Arg |
| | AU**G** | Met | AC**G** | Thr | AA**G** | Lys | AG**G** | Arg |
| G | GU**U** | Val | GC**U** | Ala | GA**U** | Asp | GG**U** | Gly |
| | GU**C** | Val | GC**C** | Ala | GA**C** | Asp | GG**C** | Gly |
| | GU**A** | Val | GC**A** | Ala | GA**A** | Glu | GG**A** | Gly |
| | GU**G** | Val | GC**G** | Ala | GA**G** | Glu | GG**G** | Gly |

**FIGURA 27-7 "Dicionário" das palavras que codificam aminoácidos no mRNA.** Os códons são escritos na direção 5′ → 3′. A terceira base de cada códon (em negrito) desempenha um papel menor na especificação do aminoácido em relação às duas primeiras. Os três códons de parada estão sombreados em cor salmão e o códon de iniciação AUG em verde. Todos os aminoácidos, com exceção da metionina e do triptofano, têm mais de um códon. Na maioria dos casos, os códons que especificam os aminoácidos diferem apenas na terceira base.

Vários códons apresentam funções especiais (Figura 27-7). O **códon de iniciação** AUG é o sinal mais comum para o início de um polipeptídeo em todas as células, além de codificar resíduos Met nas posições internas dos polipeptídeos. Os **códons de parada** (UAA, UAG e UGA), também denominados códons de término ou códons sem sentido, geralmente sinalizam o fim da síntese de polipeptídeos e não codificam qualquer aminoácido conhecido. Algumas exceções a essas regras são discutidas no Quadro 27-1.

Como será discutido na Seção 27.2, o início da síntese de proteínas na célula é um processo elaborado que depende dos códons de iniciação e outros sinais no mRNA. Em uma retrospectiva, os experimentos de Nirenberg, Khorana e outros pesquisadores para identificar a função dos códons não deveriam ter funcionado na ausência dos códons de iniciação. Casualmente, as condições experimentais permitiram que a síntese ocorresse sem que essas exigências normais de iniciação estivessem totalmente cumpridas. A diligência e o acaso levaram a uma importante descoberta – fato bastante comum na história da bioquímica.

Em uma sequência aleatória de nucleotídeos, 1 a cada 20 códons em cada fase de leitura é, em média, um códon de parada. Geralmente, uma fase de leitura sem um códon de parada entre 50 ou mais códons é considerada uma **fase de leitura aberta** (**ORF**, de *open reading frame*). Longas fases de leitura aberta geralmente correspondem a genes que codificam proteínas. Na análise de bancos de dados de sequências, programas sofisticados são utilizados na busca de fases de leitura aberta para encontrar genes em meio a um imenso mar de DNA não gênico. Um gene ininterrupto que codifica uma proteína típica de peso molecular de 60.000 requereria uma fase de leitura aberta com 500 códons ou mais.

Uma característica intrigante do código genético é que um aminoácido pode ser codificado por mais de um códon, de modo que o código é considerado **degenerado**. Isso *não* significa que o código seja falho: apesar de um aminoácido possuir um ou mais códons, cada códon codifica apenas um aminoácido. A degeneração do código não é uniforme. Enquanto a metionina e o triptofano têm, cada um, apenas um códon, três aminoácidos (Arg, Leu, Ser), por exemplo, têm seis códons cada, cinco aminoácidos têm quatro, a isoleucina tem três, e nove aminoácidos têm dois (Tabela 27-3).

O código genético é quase universal. Com a exceção intrigante de algumas pequenas variações nas mitocôndrias, em algumas bactérias e em alguns eucariotos unicelulares (Quadro 27-1), os códons dos aminoácidos são idênticos em

**TABELA 27-3** A degeneração do código genético

| Aminoácido | Número de códons | Aminoácido | Número de códons |
|---|---|---|---|
| Met | 1 | Tyr | 2 |
| Trp | 1 | Ile | 3 |
| Asn | 2 | Ala | 4 |
| Asp | 2 | Gly | 4 |
| Cys | 2 | Pro | 4 |
| Gln | 2 | Thr | 4 |
| Glu | 2 | Val | 4 |
| His | 2 | Arg | 6 |
| Lys | 2 | Leu | 6 |
| Phe | 2 | Ser | 6 |

**QUADRO 27-1 Exceções que provam a regra: variações naturais no código genético**

Em bioquímica, bem como em outras disciplinas, exceções às regras gerais podem ser problemáticas para os professores e frustrantes para os alunos. Ao mesmo tempo, no entanto, elas nos ensinam que a vida é complexa e nos inspiram para a busca de novas surpresas. Entender as exceções pode até mesmo reforçar a regra original de maneira surpreendente.

Seria de se esperar que o código genético tivesse poucas variações. Mesmo a substituição em um único aminoácido pode ter profundos efeitos deletérios na estrutura de uma proteína. Ainda assim, ocorrem variações no código em alguns organismos, e essas variações são interessantes e instrutivas. Os tipos de variações e sua raridade fornecem fortes evidências de uma origem evolutiva comum para todos os seres vivos.

Para alterar o código, as mudanças devem ocorrer no(s) gene(s) que codifica(m) um ou mais tRNAs, sendo o anticódon o alvo mais óbvio para a alteração. Tal mudança levaria a uma inserção sistemática de um aminoácido em um códon que, de acordo com o código padrão (ver Figura 27-7), não é específico para aquele aminoácido. O código genético, na verdade, é definido por dois elementos: (1) os anticódons nos tRNAs (que determinam onde um aminoácido é inserido em uma cadeia polipeptídica em crescimento) e (2) a especificidade das enzimas – as aminoacil-tRNA-sintases – que carregam aminoácidos nos tRNAs, assim determinando a identidade do aminoácido ligado a um determinado tRNA.

A maioria das mudanças repentinas no código teria efeitos catastróficos nas proteínas celulares; portanto, é mais provável que alterações no código persistiram onde relativamente poucas proteínas seriam afetadas – como em genomas pequenos que codificam poucas proteínas. As consequências biológicas de uma mudança no código poderiam também ser reduzidas restringindo-se as mudanças aos três códons de parada, os quais geralmente não ocorrem *dentro* de genes (ver Quadro 27-4 para as exceções a *essa* regra). Esse padrão é de fato observado.

Das pouquíssimas variações conhecidas no código genético, a maioria ocorre no DNA mitocondrial (mtDNA), o qual codifica apenas 10 ou 20 proteínas. As mitocôndrias têm seus próprios tRNAs; portanto, as variações no seu código não afetam o genoma celular, que é muito maior. As mudanças mais comuns nas mitocôndrias envolvem códons de parada. Essas mudanças afetam a terminação nos produtos de apenas um grupo de genes, e às vezes os efeitos são mínimos, porque os genes têm códons de parada múltiplos (redundantes).

O mtDNA de vertebrados tem genes que codificam 13 proteínas, 2 rRNAs e 22 tRNAs (ver Figura 19-40a). O pequeno número de alteração nos códons, aliado a um conjunto incomum de regras de oscilação (p. 1110), faz os 22 tRNAs serem suficientes para decodificar os genes que carregam a mensagem para a síntese das 13 proteínas, enquanto no código padrão são necessários 32 tRNAs. Nas mitocôndrias, essas mudanças podem ser vistas como uma aerodinâmica genômica, pois um genoma menor confere uma vantagem na replicação para a organela. Quatro famílias de códons (nas quais o aminoácido é determinado pelos dois primeiros nucleotídeos) são decodificadas por um único tRNA com um resíduo U na primeira posição (oscilante) no anticódon. Ou o U pareia, de alguma forma, com qualquer uma das quatro possíveis bases na terceira posição do códon, ou um mecanismo do tipo "dois de três" é utilizado – ou seja, não é necessário o pareamento de bases na terceira posição. Outros tRNAs reconhecem códons com A ou G na terceira posição, e outros, ainda, reconhecem U ou C, de modo que praticamente todos os tRNAs reconhecem dois ou quatro códons.

No código padrão, apenas dois aminoácidos são especificados por um único códon: metionina e triptofano (ver Tabela 27-3). Se todos os tRNAs mitocondriais reconhecem dois códons, seria de se esperar códons adicionais para Met e Trp nas mitocôndrias. E foi verificado que a variação de códon mais comum está no códon de parada UGA que especifica o triptofano. O $tRNA^{Trp}$ reconhece e insere um resíduo Trp tanto para o códon UGA como para o códon normal do Trp, UGG. A segunda variação mais comum é a conversão de AUA, de um códon que codifica Ile, para um códon que codifica Met; o códon normal para Met é AUG, e um único tRNA reconhece ambos os códons. As variações de código conhecidas nas mitocôndrias estão resumidas na Tabela Q-1.

Considerando as mudanças bem mais raras que ocorrem nos códigos de genomas celulares (para diferenciar dos mitocondriais), constatou-se que a única variação em uma bactéria é, novamente, o uso de UGA para codificar resíduos Trp, o que ocorre no organismo unicelular de vida livre mais simples, o *Mycoplasma capricolum*. Entre os eucariotos, raras mudanças de código extramitocondriais são observadas em algumas espécies de protistas ciliados, em que ambos os códons de parada UAA e UAG podem especificar a glutamina. Também existem casos raros e interessantes nos quais códons de parada foram adaptados para codificar aminoácidos que não estão entre os 20 aminoácidos-padrão, como detalhado no Quadro 27-3.

As mudanças no código não precisam ser absolutas; um códon nem sempre codifica um mesmo aminoácido. Por exemplo, em muitas bactérias – incluindo *E. coli* –, GUG (Val) é, às vezes, utilizado como códon de iniciação que especifica Met. Isso ocorre apenas para aqueles genes

todas as espécies estudadas até agora. Seres humanos, *E. coli*, a planta do tabaco, anfíbios e vírus compartilham do mesmo código genético. Portanto, parece que todas as formas de vida têm um ancestral comum na escala evolutiva, cujo código genético foi preservado ao longo da evolução biológica. Até mesmo as variações reforçam esse tema.

## A oscilação permite que alguns tRNA reconheçam mais de um códon

Quando vários códons diferentes especificam um aminoácido, a diferença entre eles geralmente se dá na terceira base (na extremidade 3′). Por exemplo, a alanina é codi-

**TABELA Q-1** Variações do código conhecidas em mitocôndrias

| | Códons* | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | UGA | AUA | AGA AGG | CUN | CGG |
| Códon normal | Término | Ile | Arg | Leu | Arg |
| Animais | | | | | |
| Vertebrados | Trp | Met | Parada | + | + |
| *Drosophila* | Trp | Met | Ser | + | + |
| Leveduras | | | | | |
| *Saccharomyces cerevisiae* | Trp | Met | + | Thr | + |
| *Torulopsis glabrata* | Trp | Met | + | Thr | ? |
| *Schizosaccharomyces pombe* | Trp | + | + | + | + |
| Fungos filamentosos | Trp | + | + | + | + |
| Tripanossomas | Trp | + | + | + | + |
| Plantas superiores | + | + | + | + | Trp |
| *Chlamydomonas reinhardtii* | ? | + | + | + | ? |

*N indica qualquer nucleotídeo; +, o códon apresenta o mesmo significado que no código normal; ?, o códon não é observado nesse genoma mitocondrial.

em que a sequência GUG está apropriadamente localizada em relação a sequências específicas de mRNA que afetam o início da tradução (como discutido na Seção 27.2).

A alteração mais surpreendente do código genético é observada em algumas espécies de fungos do gênero *Candida*, como descoberto originalmente em *Candida albicans*. *C. albicans* é um organismo com alta complexidade genômica, e ainda assim o seu código genético sofreu uma mudança significativa: o códon CUG, que normalmente codifica Leu, codifica Ser nesse organismo. A pressão de seleção natural sobre essa mudança é completamente desconhecida. Além disso, a natureza química de Ser e Leu são bastante diferentes. Entretanto, até mesmo essa mudança pode ser compreendida com base nas propriedades de um código universal. Quando vários códons codificam um mesmo aminoácido e faz uso de múltiplos tRNAs, nem todos os códons são utilizados com a mesma frequência. Em um fenômeno denominado **viés de códon**, alguns códons que codificam um aminoácido específico são utilizados mais frequentemente (às vezes muito mais frequentemente) do que outros. Os tRNAs para os códons mais utilizados estão presentes geralmente em maior concentração do que os tRNAs para códons menos usados. A degeneração de códons leva à existência de seis códons para Leu. Nas bactérias, CUG é usado frequentemente para codificar Leu. No entanto, em fungos de gêneros muito próximos a *Candida*, mas que não têm a alteração no código, o códon CUG é usado raramente para codificar Leu e geralmente está ausente em proteínas que são altamente expressas. Uma mudança no sentido da codificação do CUG teria, assim, um efeito muito menor no metabolismo celular de fungos do que se todos os códons fossem usados com a mesma frequência. A mudança no código pode ter ocorrido a partir de uma perda gradual dos códons CUG em genes e do tRNA que reconhece CUG como um códon de Leu, seguido por um evento de captura – uma mutação no anticódon de um $tRNA^{ser}$ que permitiu que este reconhecesse CUG. Alternativamente, pode ter havido um estágio intermediário no qual CUG fosse reconhecido como códon codificador tanto Leu como Ser, talvez com sinais específicos nos mRNAs que ajudassem um tRNA ou outro a reconhecerem códons CUG específicos (ver Quadro 27-3). A análise filogenética indica que a redefinição de CUG como um códon de Ser ocorreu nos ancestrais de *Candida* há cerca de 150 a 170 milhões de anos.

Essas variações nos mostram que o código não é tão universal como outrora se acreditava, mas que sua flexibilidade é rigorosamente restringida. As variações são, obviamente, derivadas do código normal, e nunca se encontrou qualquer exemplo de um código totalmente diferente. O limite de variações no código fortalece o princípio de que todas as formas de vida deste planeta evoluíram com base em um único (levemente flexível) código genético.

ficada pelos tripletes GCU, GCC, GCA e GCG. Os códons para a maioria dos aminoácidos podem ser simbolizados por $XY^{A}_{G}$ ou $XY^{U}_{C}$. As duas primeiras letras de cada códon são os determinantes primários da especificidade, uma característica que apresenta algumas consequências interessantes.

Os RNAs transportadores pareiam com códons do mRNA em uma sequência de três bases no tRNA denominada **anticódon**. A primeira base do códon no mRNA (lido na direção 5′→3′) pareia com a terceira base do anticódon (**Figura 27-8a**). Se o triplete do anticódon de um tRNA reconhecesse apenas um triplete de códon no pareamento

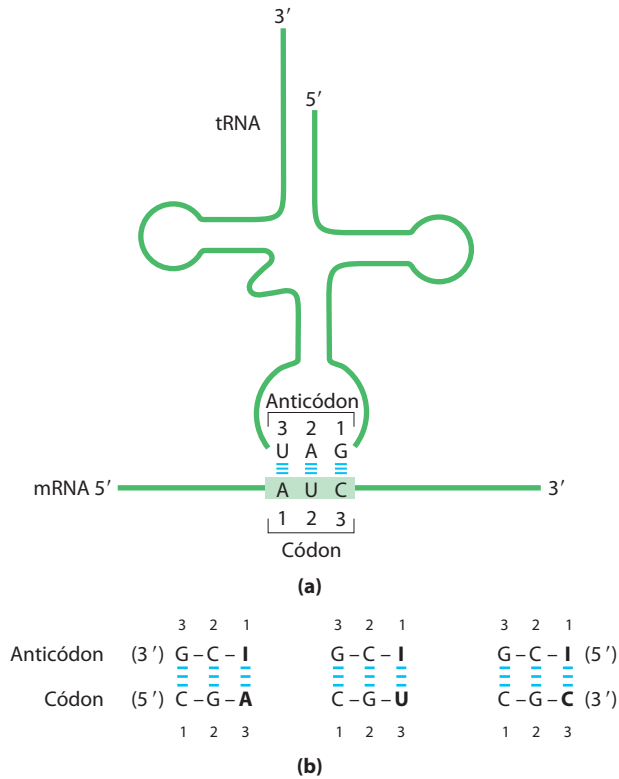



**FIGURA 27-8 Pareamento entre códon e anticódon. (a)** O alinhamento entre os dois RNAs é antiparalelo. O tRNA está mostrado na configuração tradicional de folha-de-trevo. **(b)** Três pareamentos diferentes com o códon são possíveis quando o anticódon do tRNA contém inosinato.

de bases de Watson-Crick, em todas as três posições, as células teriam um tRNA para cada códon de aminoácido. Entretanto, esse não é o caso, pois os anticódons em alguns tRNA incluem o nucleotídeo inosinato (designado como I), o qual contém uma base incomum, a hipoxantina (ver Figura 8-5b). O inosinato pode formar ligações de hidrogênio com três nucleotídeos diferentes (U, C e A; Figura 27-8b), embora esses pareamentos sejam muito mais fracos do que as ligações de hidrogênio do pareamento de bases G≡C e A═U de Watson-Crick. Em leveduras, um $tRNA^{Arg}$ tem o anticódon (5′)ICG, o qual reconhece três códons de arginina: (5′)CGA, (5′)CGU e (5′)CGC. As duas primeiras bases são idênticas (CG) e formam pares de bases de Watson-Crick fortes com as bases correspondentes do anticódon, mas a terceira base (A, U ou C) forma ligações de hidrogênio mais fracas com o resíduo I na primeira posição do anticódon.

A análise desse e de outros pareamentos códon-anticódon levou Crick a concluir que a terceira base da maioria dos códons pareia de maneira mais frouxa com a base correspondente do anticódon; a terceira base desses códons (e a primeira base dos seus anticódons correspondentes) "oscila". Crick propôs uma série de quatro relações, chamada de a **hipótese da oscilação**:

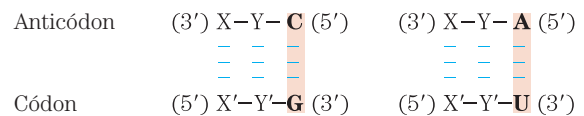
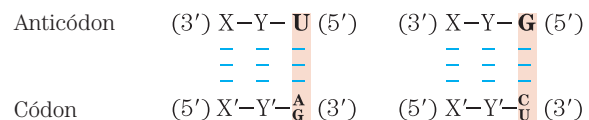
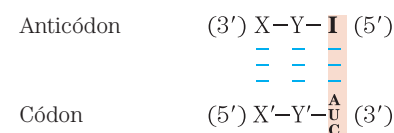
1. As duas primeiras bases de um códon no mRNA sempre estabelecem pareamentos fortes de bases do tipo Watson-Crick com as bases correspondentes no anticódon do tRNA e conferem a maior parte da especificidade do código.
2. A primeira base do anticódon (lendo na direção 5′→3′; essa base pareia com a terceira base do códon) determina o número de códons reconhecidos pelo tRNA. Quando a primeira base do anticódon é C ou A, o pareamento de bases é específico, e apenas um códon é reconhecido por aquele tRNA. Quando a primeira base é U ou G, a ligação é menos específica, e dois códons diferentes podem ser lidos. Quando inosina (I) é o primeiro nucleotídeo (oscilante) de um anticódon, três códons diferentes podem ser reconhecidos – o número máximo para qualquer tRNA. Essas relações estão resumidas na Tabela 27-4.
3. Quando um aminoácido é especificado por diversos códons diferentes, os códons que diferem em uma das duas primeiras bases requerem tRNAs diferentes.
4. Um mínimo de 32 tRNAs são necessários para traduzir todos os 61 códons (31 para codificar os aminoácidos e 1 para o início da tradução).

A base oscilante (ou terceira base) do códon contribui para a especificidade, mas, como ela pareia de forma frouxa com sua base correspondente no anticódon, ela permite uma dissociação rápida entre o tRNA e seu códon durante a síntese proteica. Se todas as três bases de um códon se envolvessem em fortes pareamentos Watson-Crick com as três bases do anticódon, os tRNAs se dissociariam muito lentamente, e isso limitaria a velocidade da síntese proteica. As interações códon-anticódon permitem um equilíbrio entre acuidade e velocidade.

## O código genético é resistente a mutações

O código genético exerce um papel interessante de proteger a integridade genômica de todo o organismo vivo. A

**TABELA 27-4** Como a base oscilante do anticódon determina o número de códons que um tRNA pode reconhecer

| | | |
|---|---|---|
| **1. Um códon reconhecido:** | | |
| Anticódon | (3′) X–Y– **C** (5′) | (3′) X–Y– **A** (5′) |
| Códon | (5′) X′–Y′–**G** (3′) | (5′) X′–Y′–**U** (3′) |
| **2. Dois códons reconhecidos:** | | |
| Anticódon | (3′) X–Y– **U** (5′) | (3′) X–Y– **G** (5′) |
| Códon | (5′) X′–Y′–**A/G** (3′) | (5′) X′–Y′–**C/U** (3′) |
| **3. Três códons reconhecidos:** | | |
| Anticódon | (3′) X–Y– **I** (5′) | |
| Códon | (5′) X′–Y′–**A/U/C** (3′) | |

**Nota:** X e Y são bases complementares capazes de parear fortemente segundo o pareamento de Watson-Crick com X′ e Y′, respectivamente. As bases oscilantes – na posição 3′ dos códons e 5′ dos anticódons – estão sombreadas em branco.

evolução não produziu um código no qual a especificidade de cada códon tivesse surgido ao acaso. Em vez disso, o código é extremamente resistente aos efeitos deletérios dos tipos mais comuns de mutações – as **mutações sem sentido** ou *missense*, nas quais um novo par de bases substitui outro. Na terceira posição do códon, que é a base oscilante, substituições de uma única base causam uma mudança no aminoácido codificado apenas em 25% dos casos. Portanto, a maioria dessas alterações consiste em **mutações silenciosas**, nas quais o nucleotídeo é diferente, mas o aminoácido codificado permanece o mesmo.

Devido aos tipos de danos espontâneos no DNA que afetam os genomas (ver Capítulo 8), a mutação sem sentido mais frequente é a **mutação de transição**, em que uma purina é substituída por uma purina, ou uma pirimidina por uma pirimidina (p. ex., G≡C substituído por A═T). Todas as três posições de um códon evoluíram de forma que existe certa resistência a mutações de transição. Uma mutação na primeira posição do códon normalmente resultará em uma mudança na codificação do aminoácido, mas tal mudança geralmente envolve um aminoácido com propriedades químicas semelhantes. Isso é fato, especialmente para aminoácidos hidrofóbicos que predominam na primeira coluna do código mostrado na Figura 27-7. Considere o códon GUU para Val. Uma alteração para AUU substituiria Val por Ile. Uma alteração para CUU substituiria Val com Leu. As mudanças resultantes na estrutura e/ou função da proteína codificada por aquele gene seriam geralmente (mas nem sempre) pequenas.

Estudos computacionais mostraram que códigos genéticos delineados ao acaso são quase sempre menos resistentes a mutações do que o código genético existente. Os resultados indicam que o código passou por uma simplificação considerável antes do surgimento de LUCA, a célula ancestral.

O código genético nos mostra como a informação para a síntese proteica é armazenada nos ácidos nucleicos e fornece algumas pistas de como essa informação é traduzida em uma proteína.

## Mudança na fase da tradução e edição do RNA afetam a maneira como o código é lido

Uma vez estabelecido o quadro de leitura durante a síntese proteica, os códons são traduzidos sem haver sobreposição ou parada até que o complexo ribossomal encontre um códon de terminação. Os outros dois quadros de leitura possíveis geralmente não contêm informação genética útil, mas uns poucos genes são estruturados de forma que os ribossomos "soluçam" em um determinado ponto durante a tradução dos respectivos mRNAs, mudando o quadro de leitura daquele ponto em diante. Esse parece ser um mecanismo para permitir que duas ou mais proteínas relacionadas, porém diferentes, possam ser produzidas a partir de um único transcrito, ou para regular a síntese de uma proteína.

Um dos exemplos mais bem documentados de **mudança de fase de tradução** ocorre durante a tradução do mRNA dos genes sobrepostos *gag* e *pol* do vírus do sarcoma de Rous (ver Figura 26-34). A fase de leitura para *pol* é deslocado para a esquerda em um par de bases (fase de leitura –1) em relação à fase de leitura para *gag* (**Figura 27-9**).

O produto do gene *pol* (a transcritase reversa) é traduzido como uma poliproteína grande, a partir do mesmo mRNA que é usado para a proteína *gag* sozinha (ver Figura 26-33). A poliproteína, ou proteína *gag-pol*, é então clivada por digestão proteolítica para originar a transcriptase reversa madura. A produção da poliproteína requer uma mudança de quadro de leitura durante a tradução na região de sobreposição para permitir que o ribossomo contorne o códon de parada UAG no final do gene *gag* (sombreado em vermelho-claro na Figura 27-9).

Mudanças de fase de leitura ocorrem em cerca de 5% das traduções desse mRNA, de modo que a poliproteína *gag-pol* (e, depois, a transcriptase reversa) é sintetizada com uma frequência que corresponde a cerca de um vigésimo daquela da proteína *gag*, um nível suficiente para a reprodução eficiente do vírus. Em alguns retrovírus, outra mudança de fase de leitura permite a tradução de uma poliproteína ainda maior, que inclui o produto do gene *env* fundido aos produtos dos genes *gag* e *pol* (ver Figura 26-33). Um mecanismo semelhante produz ambas as subunidades $\tau$ e $\gamma$ da DNA-polimerase III de *E. coli* a partir de um único transcrito do gene *dnaX* (ver a Tabela 25-2).

Alguns mRNAs são editados antes da tradução. A **edição do RNA** pode envolver a adição, deleção ou alteração de nucleotídeos no RNA de maneira a afetar o significado do transcrito quando esse é traduzido. Adição ou deleção de nucleotídeos tem sido mais comumente observada em RNAs provenientes dos genomas de mitocôndrias e cloroplastos de eucariotos. A reação requer uma classe especial de moléculas de RNA codificadas por essas mesmas organelas, com sequências complementares aos mRNAs a serem editados. Esses RNA-guias (RNAg; **Figura 27-10**) agem como moldes para o processo de edição.

Os transcritos iniciais dos genes que codificam a subunidade II da citocromo-oxidase nas mitocôndrias de alguns protistas fornecem um exemplo de edição por inserção. Esses transcritos não correspondem precisamente às sequências necessárias na extremidade carboxil do produto proteico. Um processo de edição pós-transcricional insere quatro

**FIGURA 27-9 Mudança de fase de leitura para a tradução em um transcrito de retrovírus.** Na figura, é mostrada a região de sobreposição *gag-pol* no RNA do vírus do sarcoma de Rous.

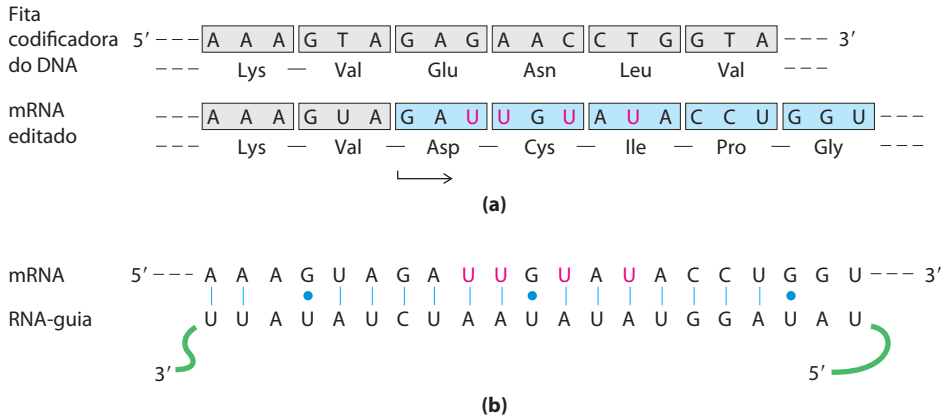



**FIGURA 27-10 Edição do RNA do transcrito do gene da subunidade II da citocromo-oxidase das mitocôndrias de *Trypanosoma brucei*. (a)** Inserção de quatro resíduos U (cor-de-rosa) produz um quadro de leitura revisada. **(b)** Uma classe especial de RNA-guias, complementares ao produto editado, agem como molde para o processo de edição. Observe a presença de dois pares de bases G═U, indicados por um ponto azul para representar que o pareamento não é do tipo Watson-Crick.

resíduos U que alteram a fase de leitura do transcrito. A Figura 27-10 mostra os resíduos U adicionados na pequena porção do transcrito que é afetada pela edição. Observe que o pareamento de bases entre o transcrito inicial e o RNA-guia envolve alguns pares de base G=U (pontos azuis), os quais são comuns em moléculas de RNA.

A edição de RNA por alteração de nucleotídeos envolve, na maioria das vezes, a desaminação enzimática de resíduos de adenosina ou de citidina, formando inosina ou uridina, respectivamente (**Figura 27-11**), mas outras alterações de base já foram também descritas. A inosina é interpretada como um resíduo G durante a tradução. As reações de desaminação da adenosina são realizadas por adenosina-desaminases que agem sobre o *R*NA (**ADAR**). As desaminações da citidina são realizadas por uma família de enzimas formada pelos peptídeos *apoB* catalíticos de edição de mRNA (**APOBEC**, de *apoB* peptídeos *e*ditores *c*atalíticos do mRNA), a qual inclui enzimas relacionadas, as desaminases induzidas por ativação (**AID**, de a*ctivation*-*i*nduced d*eaminase*). Ambos os grupos de enzimas desaminases têm um domínio catalítico homólogo, o qual contém zinco.

Um exemplo bem estudado de edição do RNA por desaminação ocorre no gene da apolipoproteína B, componente da lipoproteína de baixa densidade de vertebrados. Uma forma de apolipoproteína B, a apoB-100 ($M_r$ 513.000), é sintetizada no fígado; uma outra forma, a apoB-48 ($M_r$ 250.000), é sintetizada no intestino. Ambas são codificadas por um mRNA produzido a partir do gene da apoB-100.

Adenosina ⇌ Inosina ($H_2O$, $NH_3$)

(a)

Citidina ⇌ Uridina ($H_2O$, $NH_3$)

(b)

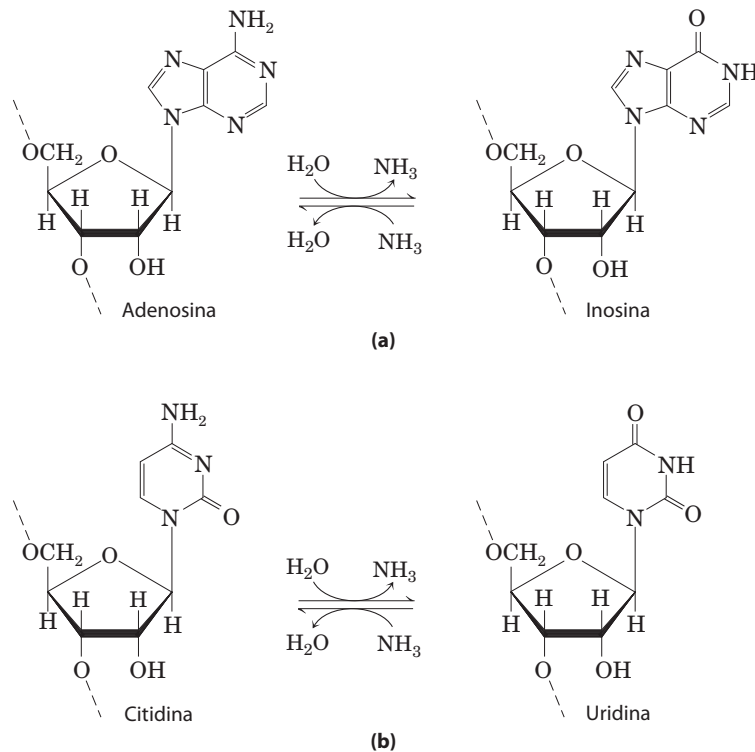



**FIGURA 27-11 Reações de desaminação que resultam em edição do RNA. (a)** A conversão de nucleotídeos de adenosina em nucleotídeos de inosina é catalisada por enzimas ADAR. **(b)** Conversões de citidina em uridina são catalisadas pelas enzimas da família APOBEC.

**FIGURA 27-12 Edição do RNA do transcrito do gene do componente apoB-100 da LDL.** A desaminação, que ocorre apenas no intestino, converte uma citidina específica em uridina, trocando um códon para a Gln em um códon de parada, produzindo uma proteína truncada.

Uma citidina-desaminase APOBEC, encontrada apenas no intestino, liga-se ao mRNA no códon 2.153 (CAA, correspondente ao resíduo de aminoácido Gln) e converte o C para um U, originando o códon de parada UAA. A apoB-48 produzida no intestino a partir desse mRNA modificado é simplesmente uma forma abreviada (correspondente à metade aminoterminal) da apoB-100 (**Figura 27-12**). Essa reação permite a síntese tecido-específica de duas proteínas diferentes a partir de um gene.

A edição de A para I realizada pela ADAR é particularmente comum em transcritos derivados de genes de primatas. É possível que 90% ou mais dessa edição ocorra em elementos Alu, um subgrupo de transposons eucarióticos denominados elementos curtos dispersos (SINE) que são particularmente comuns em genomas de mamíferos. Existem mais de um milhão de elementos Alu de 300 pb no DNA humano, constituindo cerca de 10% do genoma. Esses estão concentrados próximos a genes codificadores de proteínas, geralmente aparecendo em íntrons e em regiões não traduzidas nas extremidades 3′ e 5′ dos transcritos. Quando recém-sintetizado (antes do processamento), o mRNA humano inclui, *em média*, de 10 a 20 elementos Alu. As enzimas ADAR se ligam e realizam a edição de A para I apenas em regiões de fita dupla do RNA. A abundância de elementos Alu oferece muitas oportunidades para pareamentos de bases intramoleculares nos transcritos, fornecendo as fitas duplas necessárias para as ADAR. Algumas edições afetam as sequências codificadoras dos genes. Defeitos na função ADAR têm sido associados a várias condições neurológicas em humanos, incluindo esclerose lateral amiotrófica (ELA), epilepsia e depressão maior.

Os genomas dos vertebrados são repletos de SINE, mas muitos tipos diferentes de SINE estão presentes na maioria desses organismos. Os elementos Alu predominam apenas nos primatas. Uma análise cuidadosa de genes e de transcritos indica que a edição de A para I é de 30 a 40 vezes mais prevalente em humanos do que em camundongos, em grande parte em virtude da presença de muitos elementos Alu. A edição de A para I em grande escala e um nível aumentado de *splicing* alternativo (ver Figura 26-21) são duas características que separam os genomas de primatas daqueles de outros mamíferos. Ainda não está claro se essas reações são incidentes ou se elas tiveram papéis-chave na evolução dos primatas e, posteriormente, dos humanos.

## RESUMO 27.1 O código genético

- A sequência específica de aminoácidos de uma proteína é construída ao longo da tradução da informação contida no mRNA. Esse processo é realizado pelos ribossomos.
- Os aminoácidos são especificados pelos códons do mRNA, os quais consistem em tripletes (trincas) de nucleotídeos. A tradução requer moléculas adaptadoras, os tRNAs, que reconhecem os códons e inserem os aminoácidos de maneira sequencial apropriada no polipeptídeo.
- As sequências das bases dos códons foram deduzidas a partir de experimentos empregando mRNAs sintéticos de composição e sequência conhecidas.
- O códon AUG sinaliza o início da tradução. Os tripletes UAA, UAG e UGA sinalizam a terminação.
- O código genético é degenerado: ele tem múltiplos códons para a maioria dos aminoácidos.
- O código genético padrão é universal em todas as espécies, apresentando pequenas alterações nas mitocôndrias e em alguns organismos unicelulares. As variações ocorrem em padrões que reforçam o conceito de um código universal.
- A terceira posição em cada códon é bem menos específica do que a primeira e a segunda, e é chamada de oscilante.
- O código genético é resistente aos efeitos das mutações sem sentido.
- A mudança de fase de leitura da tradução e a edição do RNA afetam a maneira como o código genético é lido durante a tradução.

## 27.2 Síntese proteica

Como foi visto para o DNA e o RNA (Capítulos 25 e 26), a síntese de biomoléculas poliméricas pode ser considerada como consistindo nos estágios de início (ou iniciação), alongamento e término (ou terminação). Geralmente, esses processos fundamentais são acompanhados por dois estágios adicionais: a ativação de precursores, anterior à síntese, e o processamento pós-sintético do polímero completo. A síntese de proteínas segue o mesmo padrão. A ativação dos aminoácidos antes da sua incorporação nos polipeptídeos e o processamento pós-traducional do polipeptídeo completo desempenham papéis especialmente importantes em garantir tanto a fidelidade da síntese quanto a função adequada do produto proteico. O processo está esquematizado na **Figura 27-13**. Os componentes celulares envolvidos nos cinco estágios da síntese proteica em *E. coli* e em outras bactérias estão listados na Tabela 27-5; os requerimentos nas células eucarióticas são bastante semelhantes, mas em alguns casos o número de componentes envolvidos é maior. Um panorama inicial dos estágios da síntese proteica fornece um esboço útil para a discussão que segue.

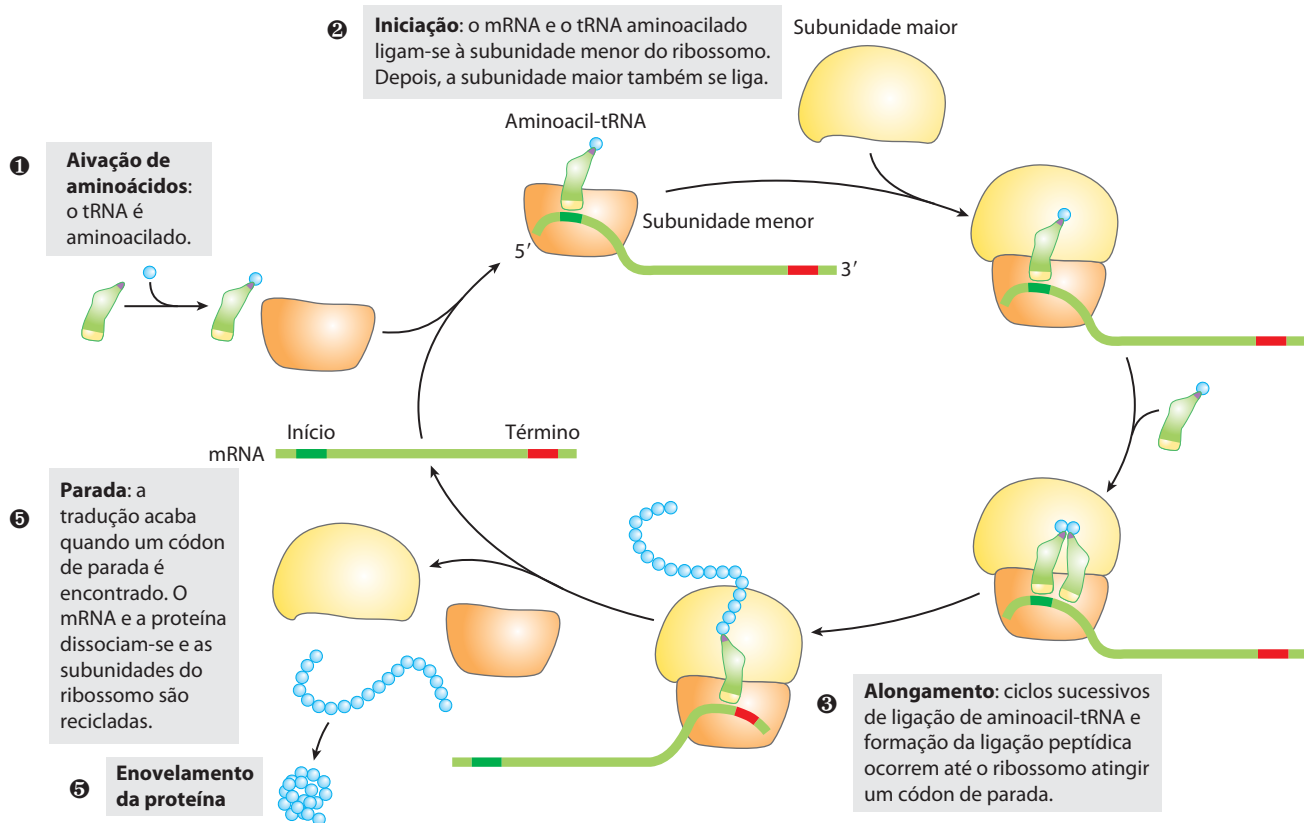



**FIGURA 27-13 Visão geral dos cinco estágios da síntese proteica.** ❶ Os tRNAs são aminoacilados. ❷ O início da tradução ocorre quando um mRNA e um tRNA aminoacilado ligam-se ao ribossomo. ❸ Durante o alongamento, o ribossomo se move ao longo do mRNA, combinando os tRNAs com cada códon e catalisando a formação da ligação peptídica. ❹ A tradução termina em um códon de parada, e as subunidades ribossomais são liberadas e recicladas para um novo ciclo de síntese proteica. ❺ Após ser sintetizada, a proteína precisa ser dobrada para atingir sua conformação ativa e os componentes ribossomais são reciclados.

## A biossíntese de proteínas ocorre em cinco estágios

**Estágio 1: Ativação de aminoácidos** Para a síntese de um polipeptídeo de sequência definida, dois requerimentos químicos fundamentais devem ser alcançados: (1) o grupamento carboxil de cada aminoácido deve ser ativado para facilitar a formação da ligação peptídica, e (2) um elo deve ser estabelecido entre cada novo aminoácido e a informação contida no mRNA que o codifica. Ambos os requerimentos são cumpridos ligando-se o aminoácido a um tRNA no primeiro estágio da síntese proteica. A ligação do aminoácido certo ao tRNA certo é fundamental nesse processo. Essa reação ocorre no citosol, e não no ribossomo. Cada um dos 20 aminoácidos é covalentemente ligado a um tRNA específico, às custas da energia do ATP, utilizando enzimas ativadoras dependentes de $Mg^{2+}$, conhecidas como aminoacil-tRNA-sintases. Quando ligados aos seus aminoácidos (aminoacilados), os tRNAs são considerados "carregados".

**Estágio 2: Iniciação** O mRNA contendo o código para a síntese do polipeptídeo se liga à subunidade menor do ribossomo e ao aminoacil-tRNA iniciador. A subunidade ribossomal maior se liga então para formar um complexo de iniciação. O aminoacil-tRNA iniciador estabelece um pareamento de bases com o códon AUG do mRNA, que sinaliza o começo do polipeptídeo. Esse processo, que requer GTP, é promovido por proteínas citosólicas denominadas fatores de iniciação.

**Estágio 3: Alongamento** O polipeptídeo nascente é alongado pela adição de unidades sucessivas de aminoácidos, as quais são ligadas covalentemente após serem levadas até o ribossomo e posicionadas corretamente pelo respectivo tRNA, o qual, por sua vez, realiza um pareamento de bases com o códon correspondente no mRNA. O alongamento requer proteínas citosólicas conhecidas como fatores de alongamento. A ligação de cada aminoacil-tRNA que entra e o movimento do ribossomo ao longo do mRNA são facilitados pela hidrólise de GTP à medida que cada resíduo é adicionado ao polipeptídeo nascente.

**Estágio 4: Terminação e reciclagem do ribossomo** A conclusão da cadeia polipeptídica é sinalizada por um códon de parada no mRNA. O novo polipeptídeo é liberado do ribossomo, auxiliado por proteínas denominadas fatores de liberação, e o ribossomo é reciclado para um novo ciclo de síntese.

**Estágio 5: Enovelamento e processamento pós-traducional** Para que possa atingir sua forma biologicamente ativa, o novo

**TABELA 27-5** Componentes necessários para os cinco principais estágios da síntese de proteínas em *E. coli*

| Estágio | Componentes essenciais |
|---|---|
| 1. Ativação de aminoácidos | 20 aminoácidos<br>20 aminoacil-tRNA-sintases<br>32 ou mais tRNAs<br>ATP<br>$Mg^{2+}$ |
| 2. Iniciação | mRNA<br>*N*-Formilmetionil-$tRNA^{fMet}$<br>Códon de iniciação no mRNA (AUG)<br>Subunidade ribossomal 30S<br>Subunidade ribossomal 50S<br>Fatores de iniciação (IF-1, IF-2, IF-3)<br>GTP<br>$Mg^{2+}$ |
| 3. Alongamento | Ribossomo 70S funcional (complexo de iniciação)<br>Aminoacil-tRNAs especificados pelos códons<br>Fatores de alongamento (EF-Tu, EF-Ts, EF-G)<br>GTP<br>$Mg^{2+}$ |
| 4. Terminação e reciclagem dos ribossomos | Códon de parada no mRNA<br>Fatores de liberação (RF-1, RF-2, RF-3, RRF)<br>EF-G<br>IF-3 |
| 5. Enovelamento e processamento pós-traducional | Chaperonas e enzimas envolvidas no enovelamento de proteínas (PPI, PDI); componentes para remoção de resíduos iniciadores e sequências sinalizadoras, processamento proteolítico adicional, modificação de resíduos terminais e ligação de grupos acetil, fosforil, metil, carboxil, de carboidratos e grupos prostéticos |

polipeptídeo precisa dobrar-se em sua conformação tridimensional apropriada. Antes ou depois de dobrar-se, o novo polipeptídeo pode sofrer processamento enzimático, incluindo remoção de um ou mais aminoácidos (geralmente da extremidade aminoterminal); adição de grupamentos acetil, fosforil, metil, carboxil, ou outros grupos a certos resíduos de aminoácidos; clivagem proteolítica, e/ou ligação de oligossacarídeos ou grupos prostéticos.

Antes de se considerar detalhadamente esses cinco estágios, é preciso examinar dois componentes-chave na biossíntese de proteínas: os ribossomos e os tRNAs.

## O ribossomo é uma complexa máquina supramolecular

Cada célula de *E. coli* contém 15.000 ribossomos ou mais, o que compreende quase um quarto do peso seco da célula. Os ribossomos bacterianos contêm cerca de 65% de rRNA e 35% de proteína; eles têm um diâmetro de aproximadamente 18 nm e são compostos de duas subunidades diferentes, com coeficientes de sedimentação de 30S e 50S e um coeficiente de sedimentação combinado de 70S. Ambas as subunidades têm dúzias de proteínas ribossomais e pelo menos uma molécula grande de rRNA (Tabela 27-6).

Masayasu Nomura, 1927-2011

Após a descoberta de Zamecnik de que os ribossomos são os complexos responsáveis pela síntese de proteínas e após a elucidação do código genético, o estudo dos ribossomos acelerou. No final da década de 1960, Masayasu Nomura e colaboradores demonstraram que as duas subunidades ribossomais podem ser separadas em RNA e proteínas que as compõem e, depois, reconstituídas *in vitro*. Sob condições experimentais apropriadas, o RNA e as proteínas se reorganizam espontaneamente para formar as subunidades 30S e 50S, quase que de forma idêntica, em estrutura e atividade, às subunidades nativas. Essa importante descoberta incentivou décadas de pesquisa acerca da estrutura e da função das proteínas e dos RNAs ribossomais. Ao mesmo tempo, métodos estruturais cada vez mais sofisticados revelaram mais e mais detalhes da estrutura dos ribossomos.

**TABELA 27-6** RNAs e proteínas que compõem os ribossomos de *E. coli*

| Subunidade | Número de proteínas diferentes | Número total de proteínas | Denominação das proteínas | Número e tipos de rRNA |
|---|---|---|---|---|
| 30S | 21 | 21 | S1-S21 | 1 (rRNA 16S) |
| 50S | 33 | 36 | L1-L36* | 2 (rRNA 5S e 23S) |

* As denominações L1 a L36 não correspondem a 36 proteínas diferentes. A proteína originalmente chamada L7 é, na verdade, uma forma modificada da L12, e L8 é um complexo de três outras proteínas. Além disso, constatou-se que L26 é a mesma proteína que S20 (e não parte da subunidade 50S). Dessa forma, a subunidade maior é constituída por 33 proteínas diferentes. Existem quatro cópias da proteína L7/L12, perfazendo 36 proteínas no total.

Com a chegada do novo milênio, foram elucidadas as primeiras estruturas em alta resolução das subunidades ribossomais de bactérias, obtidas a partir de estudos de Thomas Steitz, Ada Yonath, Venki Ramakrishnan, Harry Noller e outros pesquisadores. Esses trabalhos renderam inúmeras surpresas (**Figura 27-14a**). Em primeiro lugar, mudou o foco tradicional, que dava maior importância às proteínas que compõem os ribossomos. As subunidades ribossomais são imensas moléculas de RNA. Na subunidade 50S, os rRNA 5S e 23S formam o cerne estrutural. As proteínas são elementos secundários no complexo, decorando a superfície. Em segundo lugar, e mais importante, não existe proteína no espaço de 18 Å do sítio ativo para a formação da ligação peptídica. Assim, a estrutura em alta resolução confirma o que Harry Noller havia predito anos antes: o ribossomo é uma ribozima. Além do discernimento que as estruturas detalhadas dos ribossomos e suas subunidades fornecem sobre o mecanismo de síntese proteica (como mais bem descrito a seguir), elas estimularam uma nova visão sobre a evolução da vida (Quadro 27-2). Os ribossomos das células eucarióticas também foram por fim submetidos à análise estrutural (Figura 27-14b).

Venkatraman Ramakrishnan

Thomas A. Steitz

Ada E. Yonath

O ribossomo bacteriano é complexo, com um peso molecular combinado de ~2,7 milhões. As duas subunidades ribossomais, com formatos irregulares, encaixam-se de maneira a formar uma fenda, pela qual o mRNA passa à medida que o ribossomo se desloca ao longo dele durante a tradução (Figura 27-14a). As 57 proteínas nos ribossomos bacterianos variam enormemente em tamanho e estrutura. Os pesos moleculares variam de cerca de 6.000 a 75.000. A maioria das proteínas

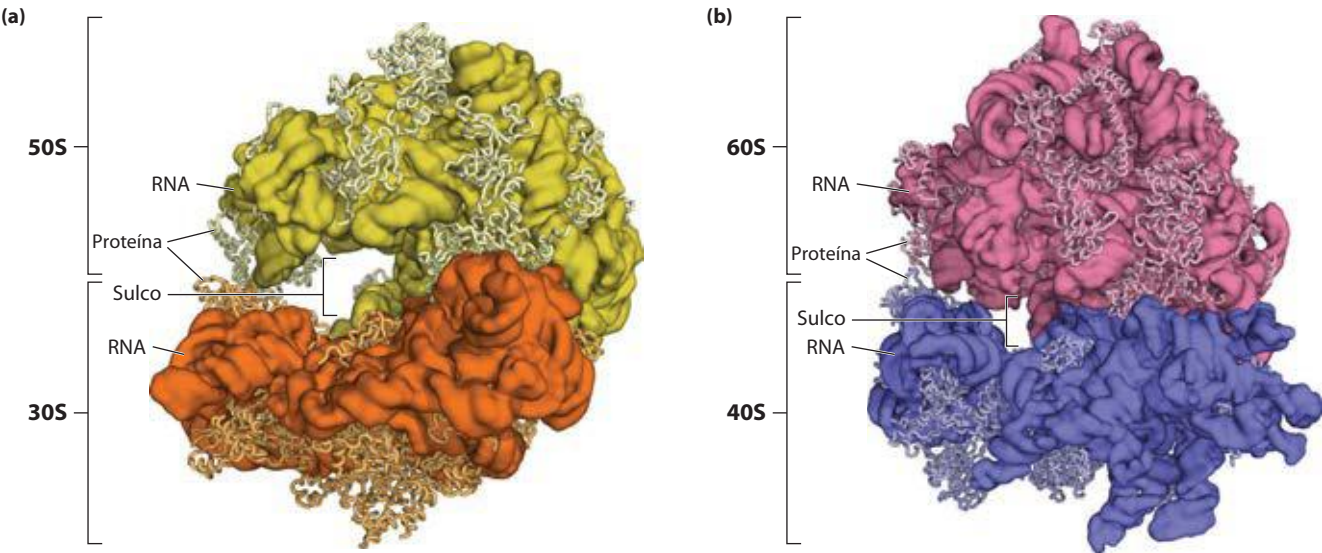



**FIGURA 27-14** **A estrutura dos ribossomos.** A nossa compreensão acerca da estrutura do ribossomo melhorou muito a partir de múltiplas imagens em alta resolução dos ribossomos de bactérias e de leveduras. **(a)** Ribossomo bacteriano (derivado de PDB ID 2OW8 e PDB ID 1VSA). As subunidades 50S e 30S, juntas, formam a unidade ribossomal 70S. O sulco que existe entre as duas subunidades é o local onde ocorre a síntese proteica. **(b)** O ribossomo de leveduras apresenta estrutura semelhante, mas com complexidade um pouco maior (derivado de PDB ID 3O58 e PDB ID 3O2Z).

## QUADRO 27-2 De um mundo de RNA para um mundo de proteína

As ribozimas existentes hoje geralmente realizam um dos dois seguintes tipos de reações: clivagem hidrolítica de ligações fosfodiéster ou transferências de grupos fosforil (Capítulo 26). Em ambos os casos, os substratos das reações também são moléculas de RNA. Os RNAs ribossomais fornecem uma importante expansão da classe de ribozimas catalíticas conhecidas. Combinada com a pesquisa laboratorial acerca das potenciais funções catalíticas do RNA (ver Quadro 26-3), a ideia de um mundo de RNA como precursor das formas de vida atuais se torna cada vez mais atraente.

Um mundo de RNA viável exigiria um RNA capaz de se autorreplicar, um metabolismo primitivo para gerar os ribonucleotídeos precursores necessários, e um limite celular para ajudar a concentrar os precursores e sequestrá-los do meio externo. As exigências para a catálise de reações envolvendo um conjunto crescente de metabólitos e macromoléculas poderiam ter levado ao surgimento de RNAs catalíticos maiores e mais complexos. Os muitos grupos fosforil negativamente carregados na molécula de RNA limitam a estabilidade das moléculas de RNA muito grandes. Em um mundo de RNA, cátions divalentes ou outros grupos carregados positivamente poderiam ser incorporados nas estruturas para aumentar a estabilidade.

Alguns peptídeos poderiam estabilizar moléculas grandes de RNA. Por exemplo, muitas proteínas ribossomais em células eucarióticas atuais têm longas extensões, desprovidas de estruturas secundárias, que serpenteiam para dentro dos rRNAs e ajudam a estabilizá-los (Figura Q-1). A síntese de peptídeos catalisada por ribozimas poderia, assim, ter evoluído inicialmente como parte de uma solução para manter a estrutura de moléculas grandes de RNA. A síntese de peptídeos pode ter ajudado a estabilizar ribozimas grandes, mas esse avanço também marcou o início do final do mundo de RNA. Uma vez tornada possível a síntese de peptídeos, o potencial catalítico maior das proteínas teria dado início a uma transição irreversível para um sistema metabólico dominado por proteínas.

A maioria dos processos enzimáticos foi, então, entregue por fim às proteínas – mas não todos. Em todos os organismos, a tarefa crucial de sintetizar proteínas continua, ainda hoje, um processo catalisado por ribozimas. Parece haver apenas um bom arranjo (ou alguns poucos) de resíduos nucleotídicos no sítio ativo de uma ribozima capaz de catalisar a síntese de peptídeos. Os resíduos de rRNA que parecem estar envolvidos na atividade peptidil-transferase dos ribossomos são altamente conservados nos rRNAs da subunidade ribossomal maior de todas as espécies. Utilizando evolução *in vitro* (SELEX; ver Quadro 26-3), pesquisadores isolaram ribozimas artificiais que realizam a síntese de peptídeos. Curiosamente, a maioria delas inclui o octeto de ribonucleotídeos (5′)AUAACAGG(3′), uma sequência altamente conservada, encontrada no sítio ativo da peptidil-transferase nos ribossomos de todas as células. Pode ser que haja apenas uma solução ótima para o problema químico global da síntese de proteínas de sequência definida catalisada por ribozimas. A evolução encontrou essa solução uma vez, e até agora nenhuma forma de vida parece ter conseguido alterá-la.

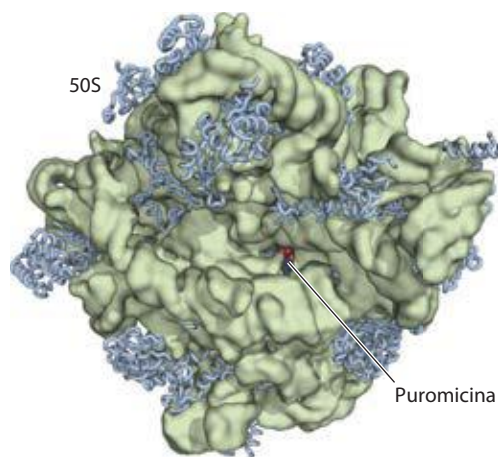



**FIGURA Q-1** A subunidade 50S de um ribossomo bacteriano (PDB ID 1Q7Y). Os esqueletos proteicos são mostrados como estruturas em azul que serpenteiam; os componentes rRNA são transparentes. Extensões não estruturadas de muitas proteínas ribossomais serpenteiam para dentro das estruturas de rRNA, ajudando a estabilizá-las. A puromicina ligada, mostrada em vermelho, indica o sítio ativo para atividade peptidil-transferase do rRNA.

tem domínios globulares organizados na superfície do ribossomo. Algumas também têm extensões alongadas que se projetam para dentro do cerne de rRNA do ribossomo, estabilizando sua estrutura. As funções de algumas dessas proteínas ainda não foram elucidadas em detalhe, mas parece evidente que muitas delas têm papel estrutural.

As sequências dos rRNAs de muitos organismos são hoje conhecidas. Cada um dos três rRNAs fita simples de *E. coli* tem uma conformação tridimensional específica, que apresenta longos pareamentos de bases intramoleculares. Os padrões de enovelamento dos rRNAs são altamente conservados em todos os organismos, particularmente as regiões envolvidas em funções-chaves (**Figura 27-15**). As estruturas secundárias propostas para os rRNAs foram confirmadas em grande parte, com base em métodos de análise estrutural, mas falham em transmitir as extensas redes de interações terciárias aparentes na estrutura completa.

Os ribossomos das células eucarióticas (exceto os ribossomos das mitocôndrias e dos cloroplastos) são maiores e mais complexos do que os ribossomos bacterianos (**Figura 27-16**, compare com a Figura 27-14b), com um diâmetro de cerca de 23 nm e um coeficiente de sedimentação de cerca de 80S. Eles também têm duas subunidades, que variam em tamanho entre as espécies, mas têm, em média, 60S e

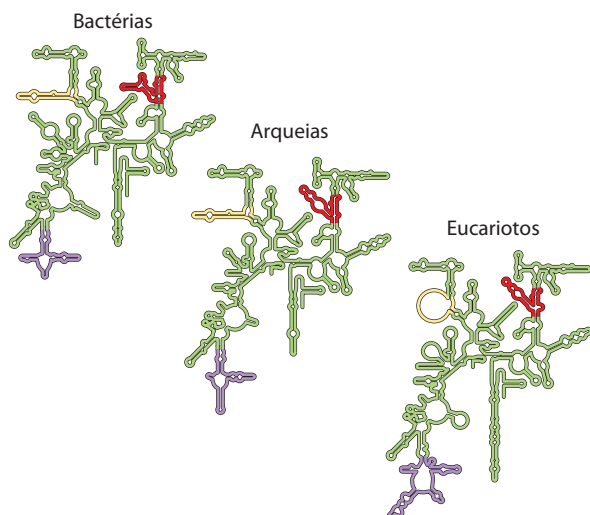



**FIGURA 27-15 Conservação da estrutura secundária no rRNA da subunidade menor nos três domínios da vida.** Vermelho, amarelo e lilás indicam as regiões em que as estruturas dos rRNAs de bactérias, arqueias e eucariotos divergiram. As regiões conservadas são mostradas em verde.

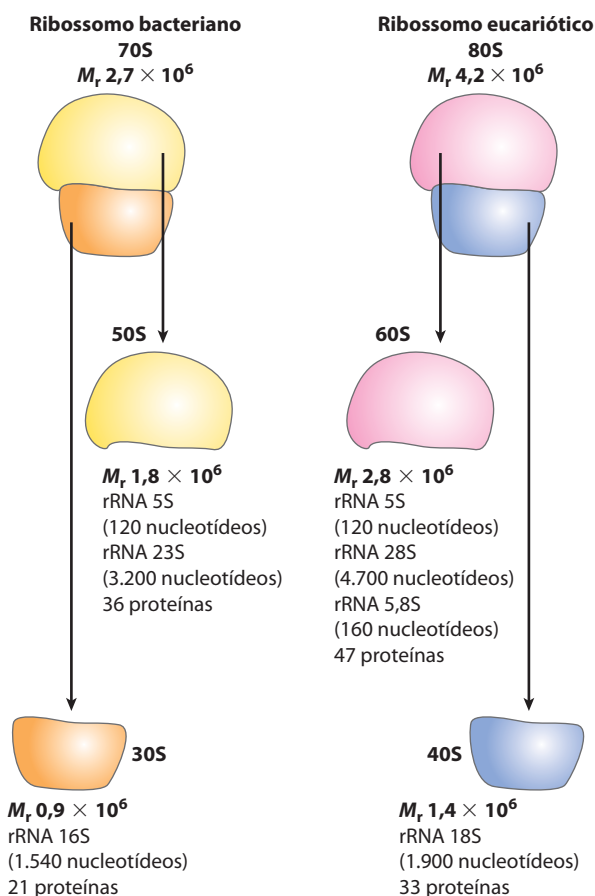



**FIGURA 27-16 Resumo da composição e da massa dos ribossomos de bactérias e de eucariotos.** As subunidades ribossomais estão identificadas pelos seus valores S (unidade Svedberg), coeficientes de sedimentação que se referem às suas velocidades de sedimentação em uma centrífuga. Os valores S não são aditivos quando as subunidades são combinadas, pois os valores S são proporcionais a aproximadamente 2/3 da força do peso molecular e também são afetados pela forma da partícula.

40S. Os ribossomos eucarióticos contêm, ao todo, mais de 80 proteínas diferentes. Os ribossomos de mitocôndrias e cloroplastos são um pouco menores e mais simples do que os ribossomos das bactérias. Ainda assim, a estrutura e a função dos ribossomos são surpreendentemente semelhantes em todos os organismos e organelas.

## RNA transportadores têm características estruturais próprias

Para entender como os tRNAs podem servir como adaptadores na tradução da linguagem dos ácidos nucleicos para a linguagem das proteínas, é preciso, antes, examinar suas estruturas com mais detalhe. Os RNAs transportadores são relativamente pequenos e consistem em uma única fita de RNA dobrada em uma estrutura tridimensional precisa (ver Figura 8-25a). Os tRNAs presentes nas bactérias e no citosol de eucariotos contêm entre 73 e 93 resíduos nucleotídicos, correspondendo a pesos moleculares de 24.000 a 31.000. As mitocôndrias e os cloroplastos têm tRNAs diferentes e um pouco menores. As células têm pelo menos um tipo de tRNA para cada aminoácido; pelo menos 32 tRNAs são necessários para reconhecer todos os códons de aminoácidos (alguns reconhecem mais de um códon), mas algumas células utilizam mais de 32.

O tRNA de alanina ($tRNA^{Ala}$) de leveduras foi o primeiro ácido nucleico a ser totalmente sequenciado, por Robert Holley em 1965. Ele contém 76 resíduos nucleotídicos, 10 dos quais têm bases modificadas. Comparações de tRNAs de várias espécies revelaram muitas características estruturais comuns a todos eles (**Figura 27-17**). Oito ou mais resíduos nucleotídicos têm açúcares e bases modificadas, muitos dos quais são formas metiladas derivadas das principais bases. A maioria dos tRNAs tem um resíduo guanilato (pG) na extremidade 5′, e todos têm a sequência trinucleotídica CCA(3′) na extremidade 3′. Quando desenhados em duas dimensões, o padrão de ligações de hidrogênio de todos os tRNAs forma uma estrutura de folha-de-trevo com quatro braços; o tRNA mais longo tem um quinto braço curto, ou braço extra. Em três dimensões, o tRNA tem a forma de um L torcido (**Figura 27-18**).

Robert W. Holley, 1922-1993

Dois dos braços do tRNA são cruciais para sua função adaptadora. O **braço do aminoácido** pode carregar um aminoácido específico, esterificado pelo seu grupo carboxil, ao grupo 2′ ou 3′-hidroxila do resíduo A presente na extremidade 3′ do tRNA. O **braço do anticódon** contém o anticódon. Os outros braços importantes são o **braço D**, que contém o nucleotídeo incomum di-hidrouridina (D), e o **braço T$\psi$C**, o qual contém ribotimidina (T), que não é comum nos RNAs, e pseudouridina ($\psi$), que contém uma ligação incomum carbono-carbono entre a base e a ribose (ver Figura 26-22). Os braços D e T$\psi$C contribuem com importantes interações para o enovelamento das moléculas de tRNAs, e o braço T$\psi$C interage com o rRNA da subunidade maior do ribossomo.

**FIGURA 27-17 Estrutura secundária geral, em forma de folha-de-trevo, dos tRNAs.** Os pontos grandes ao longo da estrutura representam resíduos nucleotídicos; as linhas azuis representam pares de bases. Os resíduos característicos e/ou não variáveis comuns a todos os tRNAs estão mostrados em cor salmão. Os RNAs transportadores variam em comprimento, de 73 a 93 nucleotídeos. Nucleotídeos extras ocorrem no braço extra ou no braço D. Na extremidade do braço do anticódon está a alça do anticódon, a qual sempre contém sete nucleotídeos não pareados. O braço D contém dois ou três resíduos D (5,6-di-hidrouridina), dependendo do tRNA. Em alguns tRNA, o braço D tem apenas três pares de bases ligados por ligações de hidrogênio. Os símbolos apresentados são: Pu, nucleotídeo púrico; Py, nucleotídeo pirimídico; G*, guanilato ou 2′-*O*-metilguanilato.

Após a análise das estruturas dos ribossomos e dos tRNAs, agora serão estudados em detalhe os cinco estágios da síntese proteica.

## Estágio 1: As aminoacil-tRNA-sintases ligam os aminoácidos corretos aos seus respectivos tRNA

Durante a primeira etapa da síntese de proteínas, que ocorre no citosol, as aminoacil-tRNA-sintases esterificam os 20 aminoácidos aos seus respectivos tRNAs. Cada enzima é específica para um aminoácido e um ou mais tRNAs correspondentes. A maioria dos organismos tem uma aminoacil-tRNA-sintase para cada aminoácido. Para aminoácidos com dois ou mais tRNAs correspondentes, a mesma enzima pode, geralmente, aminoacilar todos eles.

As estruturas de todas as aminoacil-tRNA-sintases de *E. coli* já foram determinadas. Os pesquisadores dividiram-nas em duas classes (Tabela 27-7), com base em diferenças consideráveis nas suas estruturas primária e terciária e no mecanismo de reação (**Figura 27-19**); essas

**TABELA 27-7** As duas classes de aminoacil-tRNA-sintases

| Classe I | | Classe II | |
|---|---|---|---|
| Arg | Leu | Ala | Lys |
| Cys | Met | Asn | Phe |
| Gln | Trp | Asp | Pro |
| Glu | Tyr | Gly | Ser |
| Ile | Val | His | Thr |

**Nota:** Aqui, Arg representa arginil-tRNA-sintase, e assim por diante. A classificação se aplica a todos os organismos para os quais as aminoacil-tRNA-sintases já foram analisadas e se baseia nas diferenças estruturais da proteína e nas diferenças dos mecanismos de ação esquematizados na Figura 27-19.

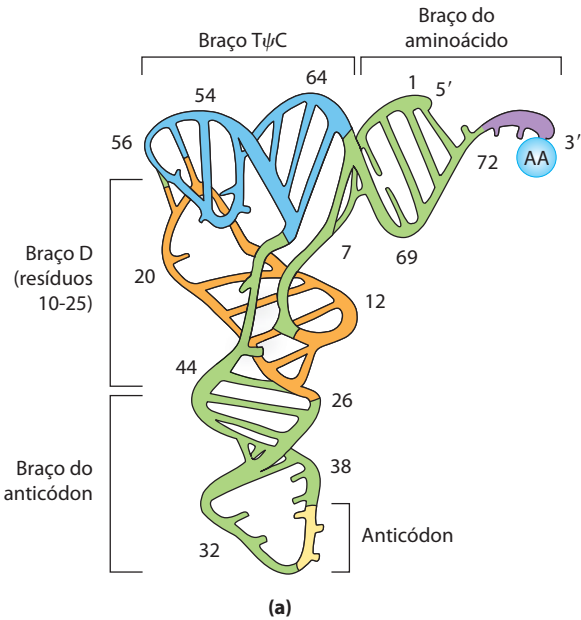
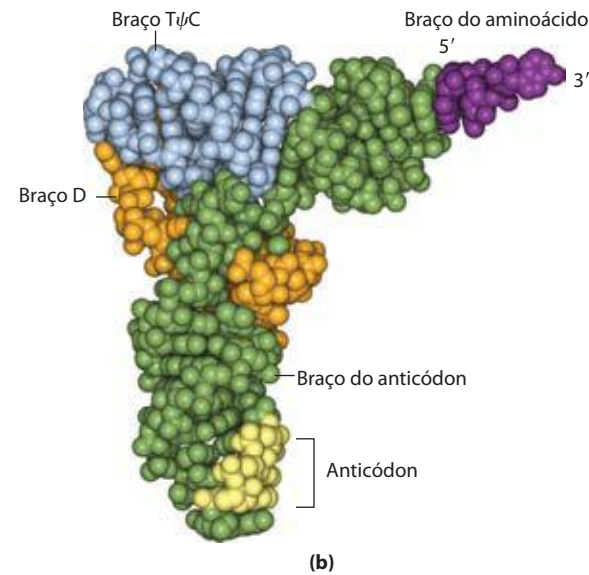
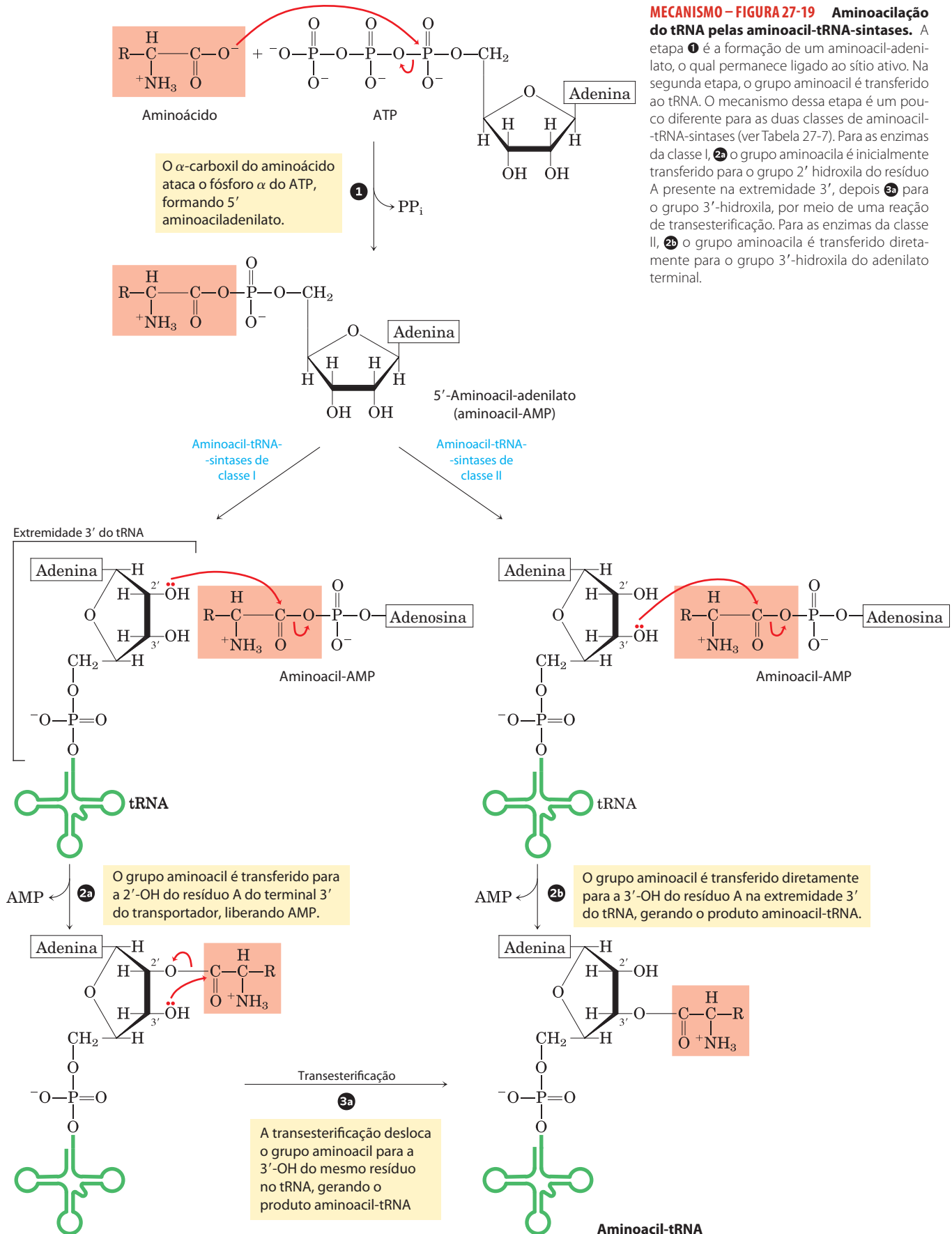
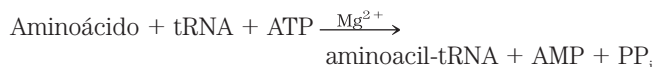



**FIGURA 27-18 Estrutura tridimensional do $tRNA^{Phe}$ de levedura, resolvida a partir de análises de difração por raios X.** A forma lembra um L torcido. **(a)** Diagrama esquemático com os vários braços identificados na Figura 27-17, apresentados em diferentes cores. **(b)** Um modelo de volume atômico, com o mesmo código de cores (PDB ID 4TRA). A sequência CCA na extremidade 3′ (em lilás) é o ponto para a ligação do aminoácido.

**MECANISMO – FIGURA 27-19 Aminoacilação do tRNA pelas aminoacil-tRNA-sintases.** A etapa ❶ é a formação de um aminoacil-adenilato, o qual permanece ligado ao sítio ativo. Na segunda etapa, o grupo aminoacil é transferido ao tRNA. O mecanismo dessa etapa é um pouco diferente para as duas classes de aminoacil-tRNA-sintases (ver Tabela 27-7). Para as enzimas da classe I, 2a o grupo aminoacila é inicialmente transferido para o grupo 2′ hidroxila do resíduo A presente na extremidade 3′, depois 3a para o grupo 3′-hidroxila, por meio de uma reação de transesterificação. Para as enzimas da classe II, 2b o grupo aminoacila é transferido diretamente para o grupo 3′-hidroxila do adenilato terminal.

duas classes são as mesmas em todos os organismos. Não existem evidências de que as duas classes compartilham um ancestral comum, e as razões biológicas, químicas ou evolutivas para a existência de duas classes de enzimas participando de processos praticamente idênticos permanecem obscuras.

A reação catalisada por uma aminoacil-tRNA-sintase é

$$\text{Aminoácido} + \text{tRNA} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{aminoacil-tRNA} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

Essa reação ocorre em duas etapas no sítio ativo da enzima. Na etapa ❶ (Figura 27-19), é formado um intermediário ligado à enzima, o aminoacil-adenilato (aminoacil-AMP). Na segunda etapa, o grupo aminoacila é transferido do aminoacil-AMP ligado à enzima para o seu tRNA específico correspondente. O caminho pelo qual ocorre essa segunda etapa depende da classe à qual pertence a enzima, como mostrado nas etapas 2a e 2b da Figura 27-19. A ligação éster resultante entre o aminoácido e o tRNA (**Figura 27-20**) tem uma energia livre de hidrólise altamente negativa ($\Delta G'^{o}$ = –29 kJ/mol). O pirofosfato formado na reação de ativação sofre hidrólise, formando fosfato, pela ação da pirofosfatase inorgânica. Assim, para cada molécula de aminoácido ativada, *duas* ligações fosfato de alta energia são gastas no final, tornando a reação global de ativação de um aminoácido essencialmente irreversível:

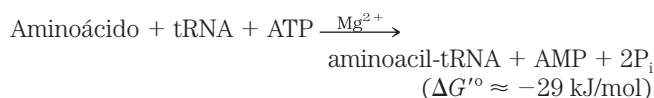
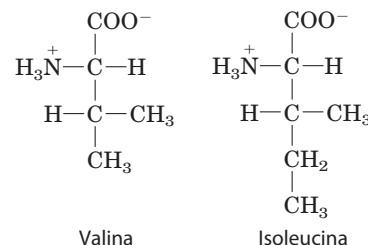
$$\text{Aminoácido} + \text{tRNA} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{aminoacil-tRNA} + \text{AMP} + 2\text{P}_i \quad (\Delta G'^{o} \approx -29 \text{ kJ/mol})$$

**Edição pelas aminoacil-tRNA-sintases** A aminoacilação do tRNA cumpre duas finalidades: (1) ativa um aminoácido para a formação de uma ligação peptídica e (2) garante o posicionamento apropriado do aminoácido no polipeptídeo nascente. A identidade do aminoácido ligado a um tRNA não é conferida no ribossomo; portanto, a ligação do aminoácido correto ao seu tRNA é essencial para a fidelidade da síntese proteica.

**FIGURA 27-20 Estrutura geral de um aminoacil-tRNA.** O grupo aminoacila é esterificado à posição 3′ do resíduo A terminal. A ligação éster que ativa o aminoácido e o une ao tRNA aparece sombreada em cor salmão na figura.

Como visto no Capítulo 6, a especificidade de uma enzima é limitada pela energia de ligação disponível das interações enzima-substrato. A discriminação entre dois substratos (aminoácidos) semelhantes foi estudada em detalhe no caso da Ile-tRNA-sintase, que distingue entre valina e isoleucina, aminoácidos que diferem em apenas um grupo metileno (—$CH_2$—):

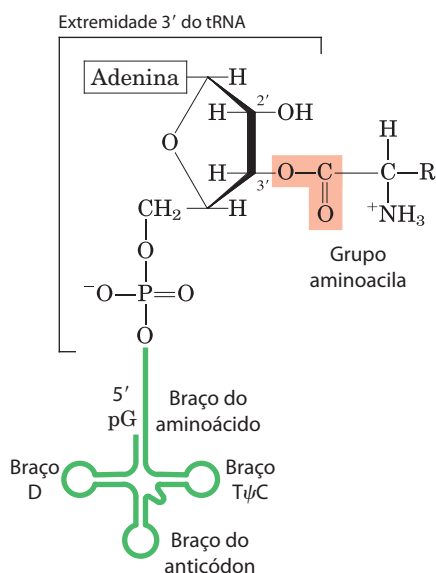
$COO^-$ / $H_3\overset{+}{N}$—C—H / H—C—$CH_3$ / $CH_3$

Valina

$COO^-$ / $H_3\overset{+}{N}$—C—H / H—C—$CH_3$ / $CH_2$ / $CH_3$

Isoleucina

A Ile-tRNA-sintetase favorece a ativação da isoleucina (para formar Ile-AMP) em relação à valina por um fator de 200 – como seria de se esperar, considerando o quanto um grupo metileno (na Ile) pode intensificar a ligação de um substrato. Ainda assim, a valina é erroneamente incorporada em proteínas em posições normalmente ocupadas por um resíduo de Ile, com uma frequência de apenas cerca de 1 em 3.000. Como ocorre esse aumento de mais de 10 vezes na precisão? A Ile-tRNA-sintase, como outras aminoacil-tRNA-sintases, tem uma função de edição.

Lembre-se de um princípio geral da discussão acerca da edição realizada pelas DNA-polimerases (ver Figura 25-7): se as interações de ligação disponíveis não fornecerem discriminação suficiente entre dois substratos, a especificidade necessária poderá ser obtida pela ligação específica do substrato em *duas etapas sucessivas*. Forçar o sistema por meio de dois filtros sucessivos tem um efeito multiplicativo. No caso da Ile-tRNA-sintase, o primeiro filtro é a ligação inicial do aminoácido à enzima e a sua ativação a aminoacil-AMP. O segundo é a ligação de qualquer produto aminoacil-AMP *incorreto* em um sítio ativo separado na enzima; um substrato que se ligar nesse segundo sítio ativo é hidrolisado. O grupo R da valina é um pouco menor do que o da isoleucina, de modo que Val-AMP cabe no sítio hidrolítico (de edição) da Ile-tRNA-sintase, enquanto o Ile-AMP não cabe. Assim, Val-AMP é hidrolisado a valina e AMP no sítio ativo de edição, e o tRNA ligado à sintase não se torna aminoacilado ao aminoácido errado.

Além da edição após a formação do aminoacil-AMP intermediário, a maioria das aminoacil-tRNA-sintases são capazes de hidrolisar a ligação éster entre aminoácidos e tRNA nos aminoacil-tRNA. Essa hidrólise é bastante acelerada em tRNA carregados incorretamente, fornecendo um terceiro filtro para melhorar a fidelidade do processo. As poucas aminoacil-tRNA-sintases que ativam aminoácidos

sem parentesco estrutural próximo (p. ex., Cys-tRNA-sintase) demonstram pouca ou nenhuma atividade de edição; nesses casos, o sítio ativo para aminoacilação é capaz de discriminar entre o substrato adequado e qualquer outro aminoácido incorreto.

A taxa de erro da síntese de proteínas (~1 erro para cada $10^4$ aminoácidos incorporados) não chega perto daquela da replicação do DNA, que é bem mais baixa. Como os defeitos nas proteínas são eliminados quando as proteínas são degradadas e não são passados adiante para as gerações seguintes, eles têm um menor significado biológico. O grau de fidelidade da síntese proteica é suficiente para garantir que a maioria das proteínas não contenha erros e que a grande quantidade de energia necessária para sintetizar uma proteína não seja desperdiçada. A presença de uma molécula de proteína com defeito geralmente não é importante quando muitas cópias corretas dessa mesma proteína estão presentes.

**Interação entre uma aminoacil-tRNA-sintase e um tRNA: um "segundo código genético"** Uma dada aminoacil-tRNA-sintetase deve ser específica não apenas para um único aminoácido, mas também para um determinado tRNA. Para a fidelidade da biossíntese de proteínas, discriminar entre dezenas de tRNA é uma tarefa tão importante quanto distinguir entre os diferentes aminoácidos. A interação entre as aminoacil-tRNA-sintases e os tRNA têm sido considerada um "segundo código genético", refletindo o papel crucial que isso apresenta para manter a precisão da síntese proteica. As regras "de codificação" parecem ser ainda mais complexas do que aquelas do "primeiro" código.

A **Figura 27-21** resume o atual conhecimento sobre os nucleotídeos envolvidos no reconhecimento dos tRNA por algumas aminoacil-tRNA-sintases. Alguns nucleotídeos são conservados em todos os tRNA e, portanto, não podem ser utilizados para discriminação. Observando mudanças nos nucleotídeos que causam alteração na especificidade pelo substrato, os pesquisadores identificaram as posições dos nucleotídeos que estão envolvidos na discriminação pelas aminoacil-tRNA-sintases. Essas posições parecem estar concentradas no braço do aminoácido e no braço do anticódon, incluindo os nucleotídeos do próprio anticódon, mas também estão localizadas em outras partes das moléculas de tRNA. A determinação das estruturas cristalográficas das aminoacil-tRNA-sintases formando um complexo com seus respectivos tRNA e ATP colaborou muito para o conhecimento acerca dessas interações (**Figura 27-22**).

Dez ou mais nucleotídeos específicos podem estar envolvidos no reconhecimento de um tRNA pela sua respectiva aminoacil-tRNA-sintase. Em alguns casos, contudo, o mecanismo de reconhecimento é bastante simples. Em diversas classes de organismos – de bactérias a humanos –, o principal determinante para o reconhecimento do tRNA pela Ala-tRNA-sintase é um único par de bases G═U no braço do aminoácido do $tRNA^{Ala}$ (**Figura 27-23a**). Um RNA sintético curto, com apenas 7 pb organizados em uma

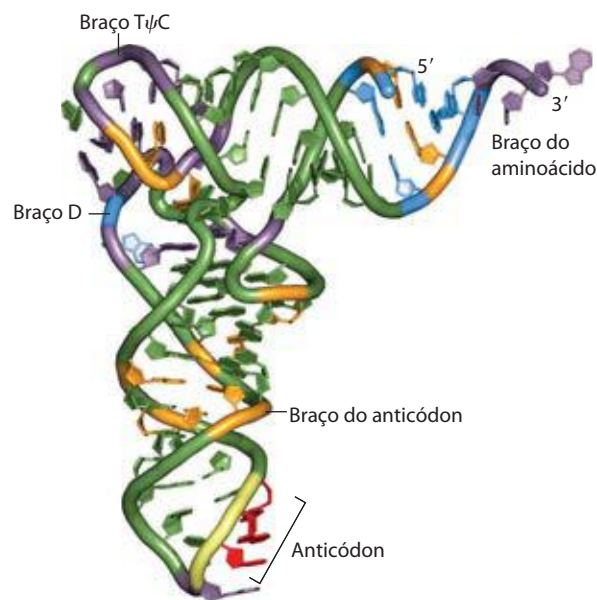
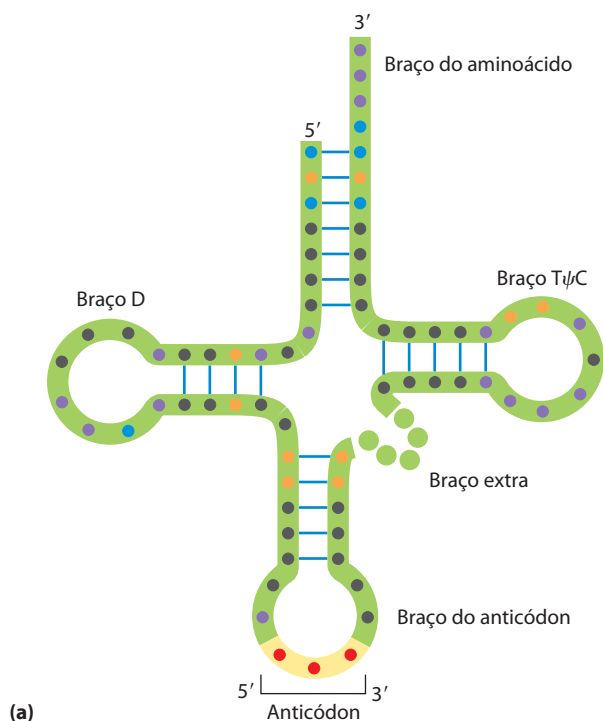



**FIGURA 27-21 Posições nos tRNAs dos nucleotídeos reconhecidos pelas aminoacil-tRNA-sintases. (a)** Algumas posições (pontos em lilás) são as mesmas em todos os tRNAs e, portanto, não podem ser utilizadas para discriminar um tRNA de outro. Outras posições são conhecidas por servirem de pontos de reconhecimento por uma (cor de laranja) ou mais (azul) aminoacil-tRNA-sintases. Outras características estruturais, além da sequência, são importantes para o reconhecimento por algumas sintases. **(b)** (PDB ID 1EHZ) As mesmas características estruturais são mostradas em três dimensões, com os resíduos em cor de laranja e azul representando, novamente, as posições reconhecidas por uma ou por mais de uma aminoacil-tRNA-sintase, respectivamente.

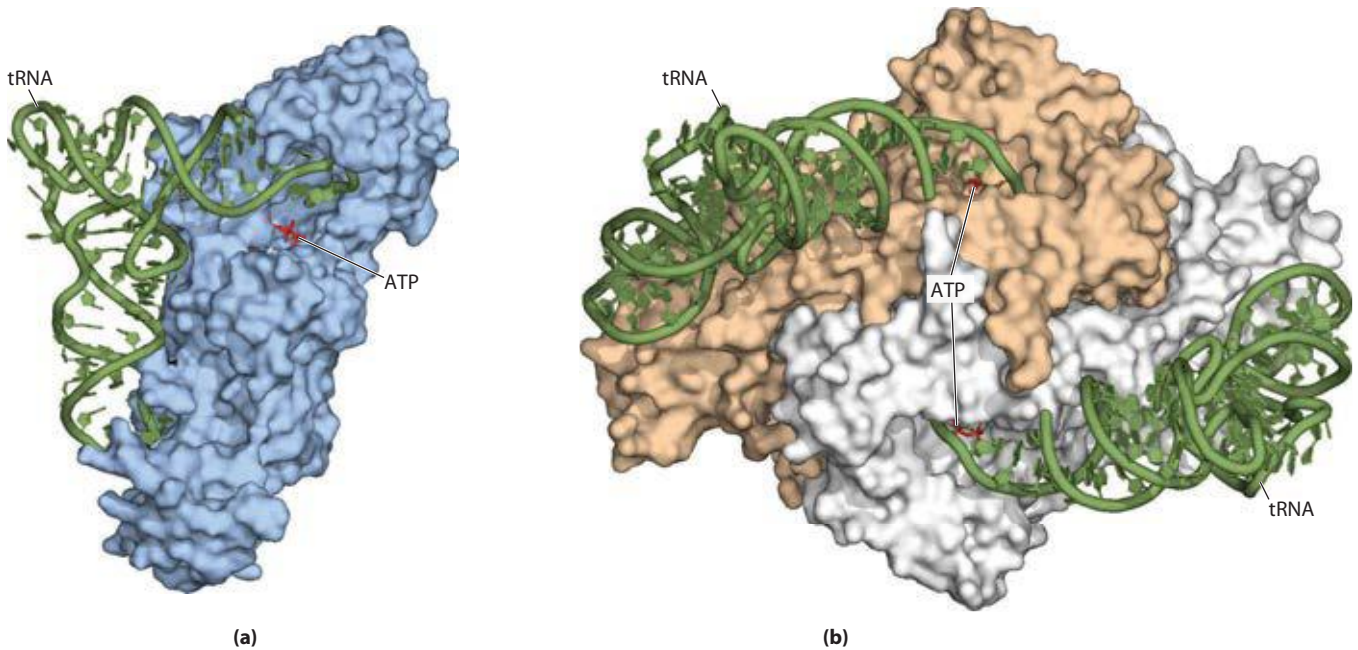



**FIGURA 27-22** **Aminoacil-tRNA-sintases.** Ambas as sintases são mostradas formando um complexo com seus respectivos tRNAs (verde). O ATP ligado (vermelho) indica o sítio ativo próximo à extremidade do braço aminoacil. **(a)** Gln-tRNA-sintase de *E. coli*, uma sintase monomérica típica da classe I (PDB ID 1QRT). **(b)** Asp-tRNA-sintase de levedura, uma sintase dimérica típica da classe II (PDB ID 1ASZ).

mini-hélice formando um grampo, é de maneira eficiente aminoacilado pela Ala-tRNA-sintetase, desde que o RNA contenha o G═U crítico (Figura 27-23b). Esse sistema relativamente simples da alanina pode ser uma relíquia evolutiva de um período no qual os oligonucleotídeos de RNA, ancestrais dos tRNAs, eram aminoacilados por meio de um sistema primitivo para a síntese de proteínas.

A interação das aminoacil-tRNA-sintases com seus respectivos tRNA é crucial para a leitura precisa do código genético. Qualquer expansão do código para incluir novos aminoácidos teria, necessariamente, de incluir um novo par aminoacil-tRNA-sintase: tRNA. Uma expansão limitada do código genético já foi observada na natureza; uma expansão maior foi obtida em laboratório (Quadro 27-3).

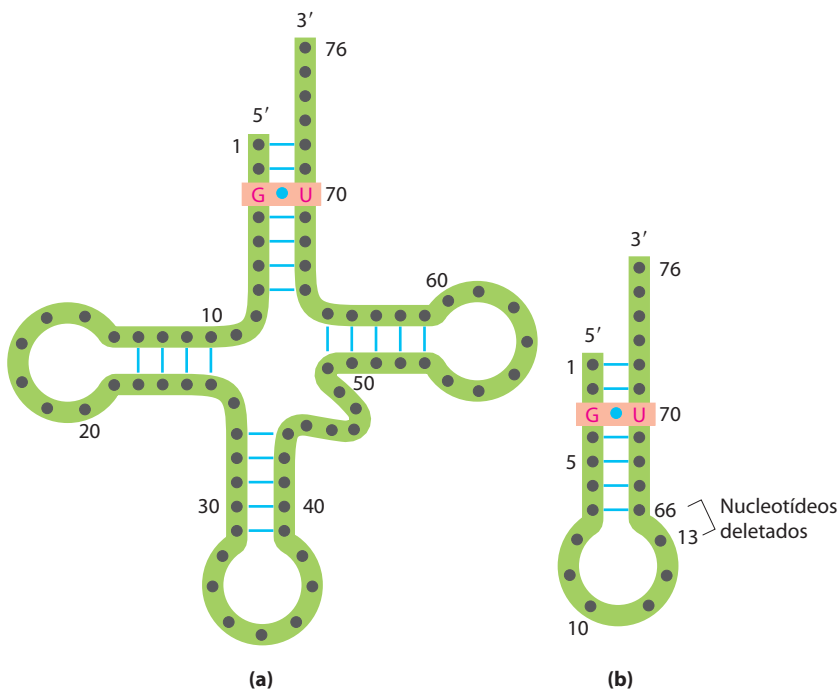



**FIGURA 27-23** **Elementos estruturais do $tRNA^{Ala}$ são necessários para o reconhecimento pela Ala-tRNA-sintase.** **(a)** Os elementos estruturais do $tRNA^{Ala}$ reconhecidos pela Ala-tRNA-sintase são simples de modo não comum. Um único par de bases G═U (em cor salmão) é o único elemento necessário para a ligação específica e para a aminoacilação. **(b)** Uma mini-hélice curta de RNA sintético, com o par de bases G═U fundamental, mas sem a maior parte das estruturas de um tRNA. Essa molécula é aminoacilada especificamente com alanina de forma quase tão eficiente quanto o $tRNA^{Ala}$ completo.

## QUADRO 27-3 Expansões naturais e não naturais do código genético

Como foi visto, os 20 aminoácidos comumente encontrados nas proteínas oferecem funcionalidade química limitada. Os sistemas vivos geralmente superam essas limitações utilizando cofatores enzimáticos ou modificando alguns aminoácidos após terem sido incorporados nas proteínas. A princípio, a expansão do código genético para introduzir novos aminoácidos nas proteínas oferece outro caminho para novas funcionalidades, mas é um caminho muito difícil de ser seguido. Tal mudança pode muito bem resultar na inativação de milhares de proteínas celulares.

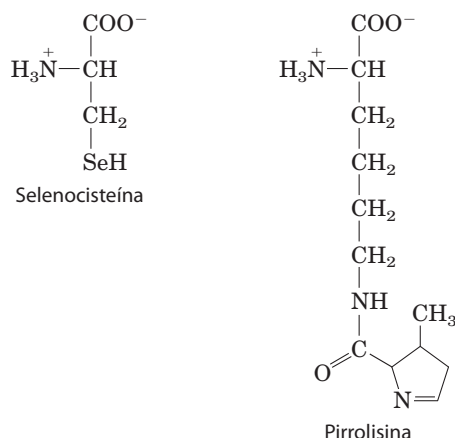
Expandir o código genético para incluir um novo aminoácido requer várias mudanças celulares. Uma nova aminoacil-tRNA-sintase precisa, geralmente, estar presente, junto com o tRNA correspondente. Ambos os componentes devem ser altamente específicos, interagindo apenas entre si e com o novo aminoácido. O novo aminoácido deve estar presente em concentrações significativas na célula, podendo acarretar a evolução de novas vias metabólicas. Como mostrado no Quadro 27-1, o anticódon no tRNA realizaria, provavelmente, um pareamento com um códon que normalmente especifica terminação. Realizar todo esse trabalho em uma célula parece improvável, mas já ocorreu tanto na natureza quanto no laboratório.

Existem, na verdade, 22 em vez de 20 aminoácidos especificados pelo código genético. Os dois aminoácidos extras são a selenocisteína e a pirrolisina, cada um sendo encontrado em poucas proteínas, mas ambos oferecem uma noção da complexidade da evolução do código genético.

$H_3\overset{+}{N}-CH(COO^-)-CH_2-SeH$

Selenocisteína

$H_3\overset{+}{N}-CH(COO^-)-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(=O)-$ (anel pirrolina com $CH_3$)

Pirrolisina

Em todas as células, algumas proteínas (como a formato-desidrogenase nas bactérias e a glutationa-peroxidase nos mamíferos) requerem selenocisteína para sua atividade. Em *E.coli*, a selenocisteína é introduzida na enzima formato-desidrogenase durante a tradução, em resposta a um códon UGA presente na leitura. Um tipo especial de Ser-tRNA, presente em níveis mais baixos do que outros Ser-tRNA, reconhece UGA e nenhum outro códon. Esse tRNA é carregado com serina pela serina-aminoacil-tRNA-sintase normal, e a serina é convertida enzimaticamente em selenocisteína por uma outra enzima, antes de ser usada no ribossomo. O tRNA carregado não reconhece qualquer códon UGA; algum sinal no contexto do mRNA, ainda a ser identificado, garante que esse tRNA reconheça apenas os poucos códons UGA presentes dentro de alguns genes que especificam selenocisteína. De fato, o UGA apresenta dupla função, codificando a terminação e (muito ocasionalmente) a selenocisteína. Essa expansão do código em particular tem um tRNA específico, como descrito antes, mas não tem uma aminoacil-tRNA-sintase específica. O processo funciona para selenocisteína, mas pode-se considerá-lo uma etapa intermediária na evolução de uma definição de código completamente nova.

A pirrolisina é encontrada em um grupo de arquibactérias anaeróbias denominadas metanogênicas (ver Quadro 22-1). Esses organismos produzem metano, como parte de seu metabolismo, sendo que o grupo das Methanosarcinaceae pode utilizar metilaminas como substratos para a metanogênese. Produzir metano a partir de monometilamina requer a enzima monometilamina-metiltransferase. O gene que codifica essa enzima tem um códon de parada UAG na fase de leitura. A estrutura da metiltransferase foi elucidada em 2002, revelando a presença do novo aminoácido pirrolisina na posição especificada pelo códon UAG. Experimentos subsequentes demonstraram que – ao contrário da selenocisteína – a pirrolisina era ligada diretamente a um tRNA específico por uma pirrolisil-tRNA-sintase específica. Essas células produzem pirrolisina por meio de uma via metabólica que ainda precisa ser elucidada. Todo o sistema apresenta as características típicas de um código genético já estabelecido, mas só funciona para códons UAG presentes nesse gene em particular. Como no caso da selenocisteína, existem, provavelmente, sinais contextuais que direcionam esse tRNA para o códon UAG correto.

Será que os cientistas conseguem competir com tal proeza evolutiva? Modificações de proteínas com vários grupos funcionais podem fornecer importantes pistas acerca da atividade e/ou da estrutura das proteínas. No entanto, a modificação de proteínas geralmente é muito trabalhosa. Por exemplo, um pesquisador que deseja ligar um novo grupo a um resíduo Cys específico deverá, de alguma maneira, bloquear os demais resíduos Cys que porventura estejam presentes na mesma proteína. Se, em vez disso, ele pudesse adaptar o código genético de forma a permitir que a célula inserisse um aminoácido modificado em um local específico na proteína, o processo seria muito mais conveniente. Peter Schultz e colaboradores fizeram exatamente isso.

Para desenvolver uma nova especificação para um códon, são necessários, como já foi citado, uma nova aminoacil-tRNA-sintase e um novo tRNA correspondente, ambos adaptados para funcionar com apenas um novo aminoácido. Tentativas para criar tal expansão "não natural" do código genético focalizaram, inicialmente, em *E. coli*. O códon UAG foi escolhido como o melhor alvo para codificar um novo aminoácido. Dos três códons de parada, UAG é o menos utilizado, e linhagens com tRNA selecionados para reconhecer UAG (ver o Quadro 27-4)

*(Continua na próxima página)*

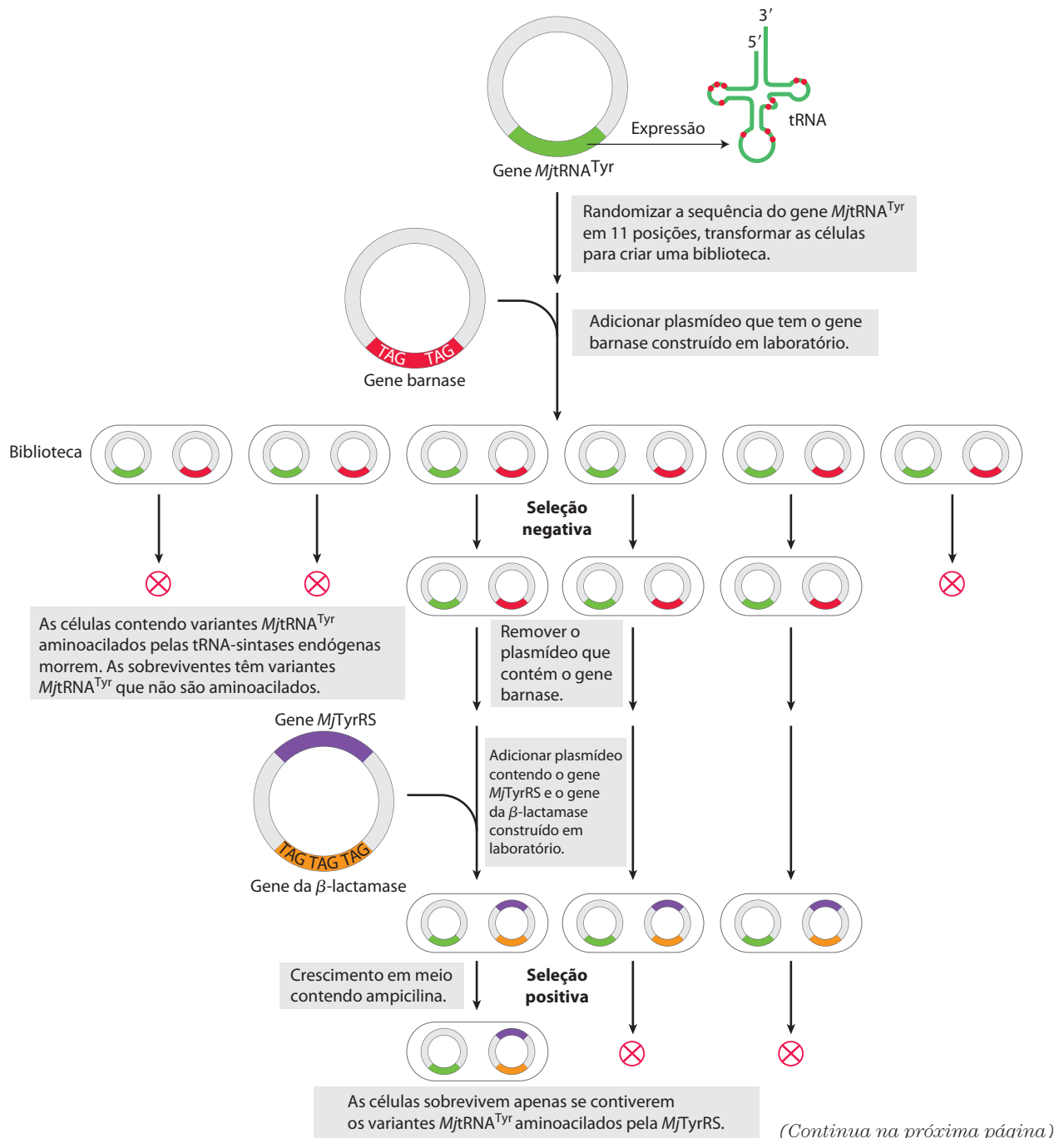



**FIGURA Q-1** Seleção dos variantes *Mj*tRNA$^{Tyr}$ que funcionam apenas com a tirosil-tRNA-sintase *Mj*TyrRS. A sequência do gene que codifica a *Mj*tRNA$^{Tyr}$, presente em um plasmídeo, é randomizada em 11 posições que não interagem com a *Mj*TyrRS (pontos vermelhos). Os plasmídeos mutantes são introduzidos em células de *E. coli* para gerar uma biblioteca de milhões de variantes *Mj*tRNA$^{Tyr}$, representados pelas seis células mostradas aqui. O gene tóxico da barnase, construído em laboratório para conter a sequência TAG, de forma que seu transcrito possua códons UAG, é introduzido em um plasmídeo separado, fornecendo uma seleção negativa. Se esse gene for expresso, as células morrem. Ele apenas será expresso se o variante *Mj*tRNA$^{Tyr}$, expresso por essas mesmas células, for aminoacilado pelas aminoacil-tRNA-sintases endógenas (de *E. coli*), inserindo um aminoácido em vez de terminar a tradução. Um outro gene, que codifica a β-lactamase e que também foi modificado em laboratório para conter a sequência TAG a fim de produzir códons de parada UAG, é inserido em um outro plasmídeo, o qual também expressa o gene que codifica a *Mj*TyrRS. Esse serve como uma forma de seleção positiva para os demais variantes de *Mj*tRNA$^{Tyr}$. Aqueles variantes que forem aminoacilados pela *Mj*TyrRS permitem a expressão do gene da β-lactamase, o qual, por sua vez, permite que as células cresçam na presença de ampicilina. Múltiplos ciclos de seleção negativa e de seleção positiva fornecem os melhores variantes de *Mj*tRNA$^{Tyr}$ aminoacilados unicamente pela *Mj*TyrRS e utilizados de maneira eficiente na tradução.

**QUADRO 27-3 Expansões naturais e não naturais do código genético (*Continuação*)**

não apresentam defeitos no crescimento das bactérias. Para criar o novo tRNA e a nova tRNA-sintase, os genes para tirosil-tRNA e sua respectiva tirosil-tRNA-sintase foram obtidos da arquibactérias *Methanococcus jannaschii* (*Mj*tRNA$^{Tyr}$ e *Mj*TyrRS). A *Mj*TyrRS não se liga à alça do anticódon do *Mj*tRNA$^{Tyr}$, permitindo que a alça do anticódon seja modificada para CUA (complementar a UAG), sem afetar a interação. Como os sistemas das bactérias e das arquibactérias são ortólogos, os componentes modificados das arquibactérias puderam ser transferidos para células de *E. coli* sem destruir o sistema de tradução intrínseco das células.

Primeiro, o gene que codifica o *Mj*tRNA$^{Tyr}$ teve de ser modificado para gerar um tRNA ideal – que não fosse reconhecido por qualquer aminoacil-tRNA-sintase endógena de *E. coli*, mas que fosse aminoacilado pela *Mj*TyrRS. Vários ciclos de seleção negativa e de seleção positiva foram desenhados e realizados para que fosse possível encontrar de maneira eficiente tal variante em meio a outros variantes do gene do tRNA (Figura Q-1). Partes da sequência do *Mj*tRNA$^{Tyr}$ foram trocadas aleatoriamente, permitindo a criação de uma biblioteca de células, em que cada uma expressava uma versão diferente do tRNA. Um gene codificando barnase (uma ribonuclease tóxica para *E. coli*) foi modificado de forma que seu transcrito de mRNA contivesse vários códons UAG, e esse gene também foi introduzido, nas células, por um plasmídeo. Se o variante de *Mj*tRNA$^{Tyr}$ expresso em uma determinada célula da biblioteca fosse aminoacilado por uma tRNA-sintase endógena, passaria a expressar o gene da barnase, e essa célula morreria (seleção negativa). As células sobreviventes conteriam os variantes de *Mj*tRNA$^{Tyr}$ que não foram aminoacilados pelas tRNA-sintases endógenas, mas com potencial de serem aminoacilados pela *Mj*TyrRS. Uma seleção positiva (Figura Q-1) foi então estabelecida, modificando o gene da $\beta$-lactamase (que confere resistência ao antibiótico ampicilina), de forma que seu transcrito contivesse vários códons UAG, e introduzindo esse gene nas células junto com o gene que codifica a *Mj*TyrRS. Os variantes de *Mj*tRNA$^{Tyr}$ que fossem aminoacilados pela *Mj*TyrRS permitiriam o crescimento em meio com ampicilina apenas quando a *Mj*TyrRS também fosse expressa na célula. Vários ciclos desse esquema de seleção negativa e de seleção positiva permitiram a identificação de um novo variante de *Mj*tRNA$^{Tyr}$ que não era afetado por enzimas endógenas, que era aminoacilado pela *Mj*TyrRS e que funcionava bem na tradução.

Em segundo lugar, a *Mj*TyrRS teve de ser modificada para reconhecer o novo aminoácido. O gene que codifica a *Mj*TyrRS foi dessa vez mutado para criar uma grande biblioteca de variantes. Os variantes que iriam aminoacilar o novo variante de *Mj*tRNA$^{Tyr}$ com aminoácidos endógenos foram eliminados utilizando a seleção com o gene da barnase. Uma segunda seleção positiva (semelhante à seleção com ampicilina descrita antes) foi realizada de forma que as células sobrevivessem somente se o variante de *Mj*tRNA$^{Tyr}$ fosse aminoacilado apenas na presença do aminoácido não natural. Vários ciclos de seleção negativa e de seleção positiva geraram um par específico tRNA-sintase-tRNA que reconhecia apenas o aminoácido não natural. Esses componentes tiveram então o nome alterado a fim de refletir o aminoácido não natural utilizado na seleção.

Utilizando essa abordagem, muitas linhagens de *E. coli* foram construídas, cada uma capaz de incorporar um determinado aminoácido não natural em uma proteína em resposta a um códon UAG. A mesma abordagem tem sido utilizada para expandir artificialmente o código genético de leveduras e até mesmo de células de mamíferos. Desse modo, mais de 30 aminoácidos diferentes (Figura Q-2) podem ser introduzidos de maneira eficiente em sítios específicos de proteínas clonadas. Como resultado, tem-se uma ferramenta cada vez mais útil e flexível para avançar nos estudos sobre a estrutura e a função das proteínas.

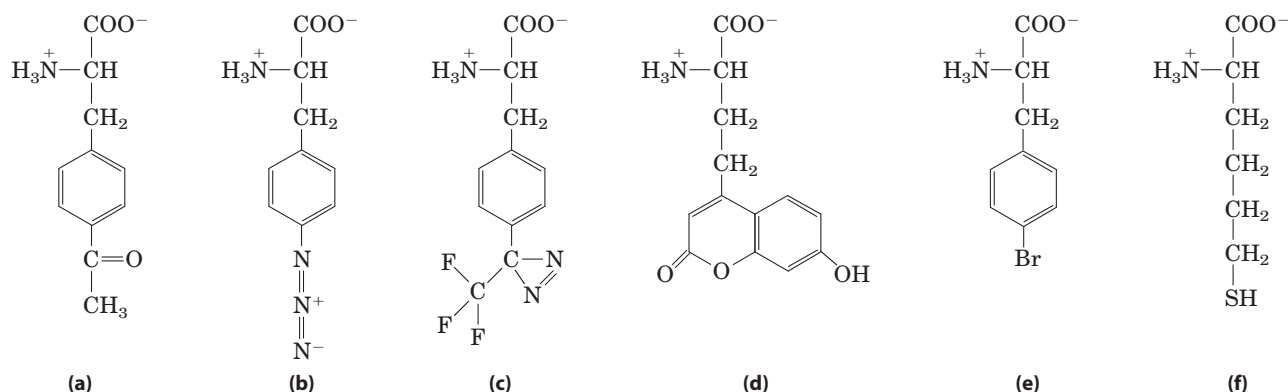



**FIGURA Q-2** Uma amostra dos aminoácidos não naturais que já foram adicionados ao código genético. Esses aminoácidos contribuem com grupos químicos reativos singulares, como **(a)** cetona, **(b)** azida, **(c)** fotoconector (grupo funcional desenhado para formar ligações covalentes com um grupo próximo quando ativado pela luz), **(d)** aminoácido altamente fluorescente, **(e)** aminoácido com átomo pesado (Br) para uso em cristalografia e **(f)** um análogo de cisteína de cadeia longa, com mais ampla capacidade de formar pontes dissulfeto.

## Estágio 2: Um aminoácido específico inicia a síntese de proteínas

A síntese de proteínas começa na extremidade aminoterminal e procede à adição de aminoácidos passo a passo em direção à extremidade carboxiterminal do polipeptídeo nascente, como determinado por Howard Dintzis em 1961 (**Figura 27-24**). O códon de iniciação AUG, dessa maneira, especifica um resíduo de metionina *aminoterminal*. Apesar de a metionina possuir apenas um códon, (5′)AUG, todos os organismos têm dois tRNAs para metionina. Um deles é utilizado exclusivamente quando (5′)AUG é o códon de iniciação para a síntese de proteínas. O outro é utilizado para codificar resíduos Met em posições internas no polipeptídeo.

A distinção entre um (5′)AUG iniciador e um interno é direta. Em bactérias, os dois tipos de tRNA específicos para metionina são designados $tRNA^{Met}$ e $tRNA^{fMet}$. O aminoácido incorporado em resposta ao códon de iniciação (5′)AUG é a *N*-formilmetionina (fMet). Ele chega ao ribossomo como *N*-formilmetionil-$tRNA^{fMet}$ (fMet-$tRNA^{fMet}$), o qual é formado em duas reações sucessivas. Primeiramente, a metionina é ligada ao $tRNA^{fMet}$ pela Met-tRNA sintase (a qual, em *E. coli*, aminoacila tanto o $tRNA^{fMet}$ quanto o $tRNA^{Met}$):

$$\text{Metionina} + tRNA^{fMet} + ATP \longrightarrow \text{Met-}tRNA^{fMet} + AMP + PP_i$$

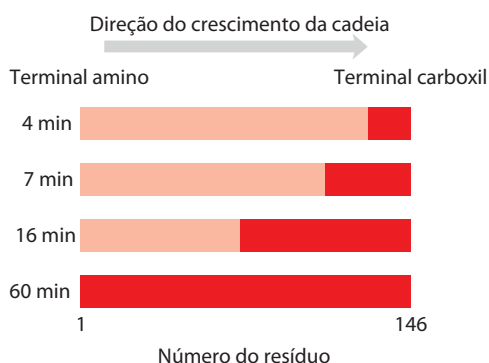
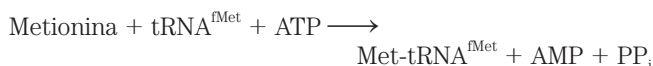
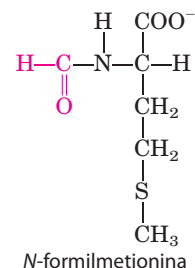



**FIGURA 27-24 Prova de que os polipeptídeos crescem pela adição de resíduos de aminoácidos em direção à porção carboxiterminal: o experimento de Dintzis.** Reticulócitos (eritrócitos imaturos) sintetizando ativamente hemoglobina foram incubados com leucina radioativa (selecionada porque ocorre frequentemente nas cadeias de $\alpha$ e $\beta$-globina). Amostras de cadeias $\alpha$ completas foram então isoladas dos reticulócitos em vários intervalos de tempo, e a distribuição da radioatividade foi determinada. As zonas em vermelho-escuro mostram as porções das cadeias completas de $\alpha$-globina contendo resíduos de Leu radioativos. Aos 4 min, apenas alguns resíduos na extremidade carboxil da $\alpha$-globina estavam marcados, pois as únicas cadeias *completas* de globina com marcador incorporado após 4 min eram aquelas cuja síntese estava praticamente completa no momento em que o marcador foi adicionado. Com tempos de incubação mais longos, segmentos sucessivamente mais longos do polipeptídeo apresentaram resíduos marcados, sempre em um bloco na extremidade carboxil da cadeia. A extremidade não marcada do polipeptídeo (aminoterminal) foi então definida como a extremidade iniciadora, isto é, os polipeptídeos crescem por adições sucessivas de aminoácidos na extremidade carboxil.

Em seguida, uma transformilase transfere um grupo formil do $N^{10}$-formiltetra-hidrofolato para o grupo amino do resíduo Met:

$$N^{10}\text{-formiltetra-hidrofolato} + \text{Met-}tRNA^{fMet} \longrightarrow \text{tetra-hidrofolato} + \text{fMet-}tRNA^{fMet}$$

A transformilase é mais seletiva do que a Met-tRNA-sintase; ela é específica para resíduos Met ligados ao $tRNA^{fMet}$, presumivelmente reconhecendo alguma característica estrutural singular daquele tRNA. Já o Met-$tRNA^{Met}$ insere metionina em posições internas nos polipeptídeos.

H—C(=O)—N(H)—C(H)(COO⁻)—CH$_2$—CH$_2$—S—CH$_3$

*N*-formilmetionina

A adição do grupo *N*-formil ao grupo amino da metionina pela transformilase impede que a fMet entre em posições internas em um polipeptídeo e, ao mesmo tempo, também permite que o fMet-$tRNA^{fMet}$ se ligue em um sítio de iniciação específico no ribossomo, o qual não aceita Met-$tRNA^{Met}$ nem qualquer outro aminoacil-tRNA.

Em células eucarióticas, todos os polipeptídeos sintetizados por ribossomos citosólicos iniciam com um resíduo Met (em vez de fMet), mas, novamente, a célula utiliza um tRNA iniciador especializado, que é diferente do $tRNA^{Met}$ utilizado em códons (5′)AUG em posições internas no mRNA. Os polipeptídeos sintetizados pelos ribossomos das mitocôndrias e dos cloroplastos, entretanto, iniciam com *N*-formilmetionina. Esse fato dá forte suporte à ideia de que as mitocôndrias e os cloroplastos se originaram de bactérias ancestrais que foram simbioticamente incorporadas em células eucarióticas precursoras em um estágio primordial da evolução (ver Figura 1-38).

Como pode um único códon (5′)AUG determinar se será inserida uma *N*-formilmetionina inicial (ou metionina, em eucariotos) ou um resíduo Met interno? Detalhes do processo de iniciação fornecem a resposta.

**As três etapas da iniciação** A **iniciação** da síntese de um polipeptídeo nas bactérias requer (1) a subunidade 30S do ribossomo, (2) o mRNA que codifica o polipeptídeo a ser produzido, (3) o fMet-$tRNA^{fMet}$ iniciador, (4) um conjunto de três proteínas denominadas fatores de iniciação (IF-1, IF-2 e IF-3), (5) GTP, (6) a subunidade 50S do ribossomo e (7) $Mg^{2+}$. A formação do complexo de iniciação se dá em três etapas (**Figura 27-25**).

Na etapa ❶, a subunidade 30S do ribossomo se liga a dois fatores de iniciação, IF-1 e IF-3. O fator IF-3 impede que as subunidades 30S e 50S se combinem prematuramente. O mRNA se liga, então, à subunidade 30S. O (5′)AUG iniciador é guiado até sua posição correta pela **sequência de Shine-Dalgarno** (assim chamada em virtude dos pes-

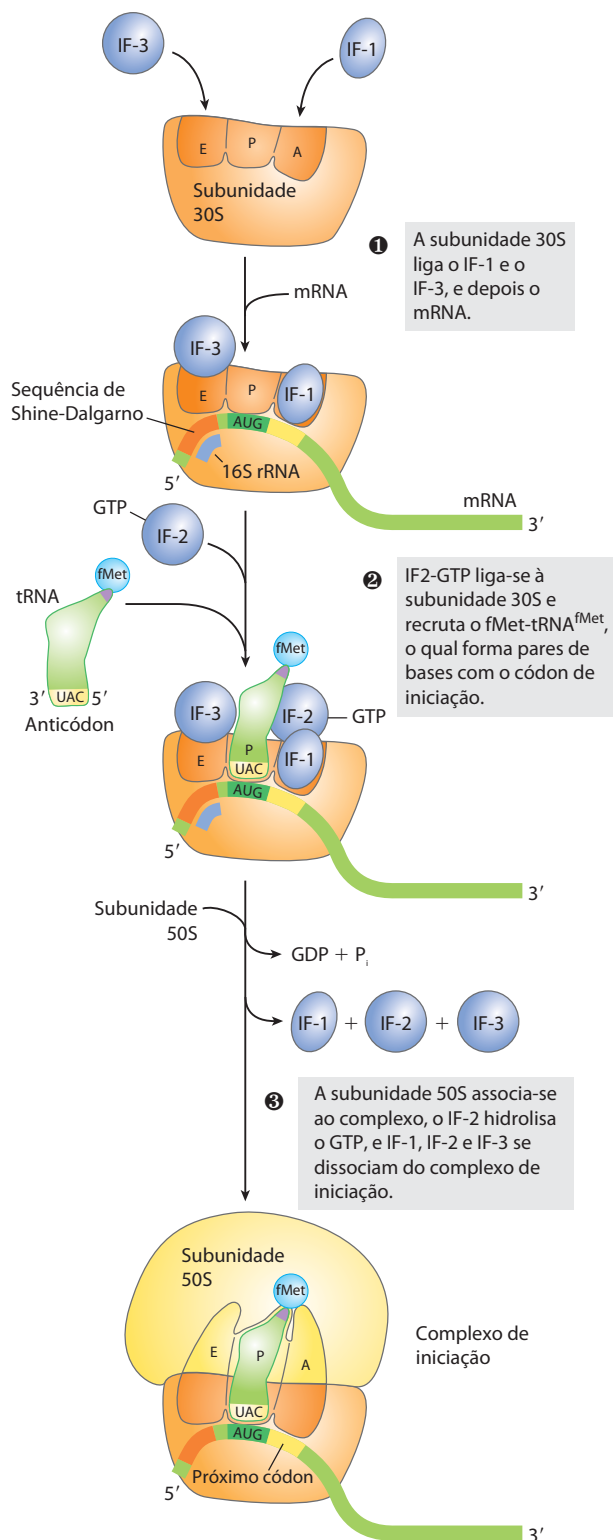



**FIGURA 27-25 Formação do complexo de iniciação em bactérias.** O complexo é formado em três etapas (descritas no texto) à custa da hidrólise de GTP, gerando GDP e $P_i$. IF-1, IF-2 e IF-3 são os fatores de iniciação. E designa o sítio de saída, P o sítio peptidil e A o sítio aminoacil. Aqui, o anticódon do tRNA está orientado no sentido de 3′ para 5′, da esquerda para a direita, como na Figura 27-8, mas contrário à orientação mostrada nas Figuras 27-21 e 27-23.

quisadores australianos que a identificaram, John Shine e Lynn Dalgarno), presente no mRNA. Essa sequência consenso é um sinal de iniciação contendo de quatro a nove resíduos de purina, 8 a 13 pb no lado 5′ do códon de iniciação (**Figura 27-26a**). A sequência realiza um pareamento de bases com uma sequência complementar rica em pirimidina próxima à extremidade 3′ do rRNA 16S da subunidade 30S do ribossomo (Figura 27-26b). Essa interação mRNA-rRNA coloca a sequência iniciadora (5′)AUG do mRNA em uma posição precisa da subunidade 30S, onde ela é necessária para o início da tradução. O (5′)AUG específico no qual o fMet-$tRNA^{fMet}$ deve se ligar é distinguido de outros códons de metionina pela sua proximidade à sequência Shine-Dalgarno no mRNA.

Os ribossomos bacterianos têm três sítios que ligam tRNA, o **sítio aminoacil** (**A**), o **sítio peptidil** (**P**) e o **sítio de saída** (**E**) (de *exit*). Os sítios A e P se ligam a um aminoacil-tRNA, enquanto o sítio E se liga apenas a tRNA não carregados, que já completaram sua tarefa no ribossomo. Ambas as subunidades 30S e 50S contribuem para as características dos sítios A e P, enquanto o sítio E é restrito à subunidade 50S. O (5′)AUG iniciador é posicionado no sítio P, o único sítio no qual o fMet-$tRNA^{fMet}$ consegue se ligar (Figura 27-25). O fMet-$tRNA^{fMet}$ é o único aminoacil--tRNA que se liga primeiro ao sítio P; durante o estágio subsequente de alongamento, todos os outros aminoacil--tRNA que chegam (incluindo o Met-$tRNA^{Met}$, que se liga a códons AUG internos), ligam-se primeiro ao sítio A e só depois aos sítios P e E. O sítio E é o sítio pelo qual os tRNA "não carregados" saem durante o alongamento. O fator IF-1 se liga ao sítio A e impede a ligação do tRNA nesse sítio durante a iniciação.

Na etapa ❷ do processo de iniciação (Figura 27-25), o complexo constituído da subunidade 30S do ribossomo, do IF-3 e do mRNA se junta ao IF-2 ligado a GTP e ao fMet--$tRNA^{fMet}$ iniciador. O anticódon desse tRNA pareia então corretamente com o códon iniciador do mRNA.

Na etapa ❸, esse grande complexo se combina com a subunidade 50S do ribossomo; simultaneamente, o GTP ligado ao IF-2 é hidrolisado a GDP e $P_i$, os quais são liberados do complexo. Nesse ponto, todos os três fatores de iniciação saem do ribossomo.

O término das etapas mostradas na Figura 27-25 produz um ribossomo funcional 70S chamado de **complexo de iniciação**, o qual contém o mRNA e o fMet-$tRNA^{fMet}$ iniciador. A ligação correta do fMet-$tRNA^{fMet}$ no sítio P no complexo de iniciação 70S é garantida por, pelo menos, três pontos de reconhecimento e de ligação: a interação códon-anticódon envolvendo o AUG iniciador posicionado no sítio P; a interação entre a sequência de Shine-Dalgarno do mRNA e o rRNA 16S, e as interações de ligação entre o sítio P do ribossomo e o fMet-$tRNA^{fMet}$. O complexo de iniciação está agora pronto para o alongamento.

**A iniciação nas células eucarióticas** A tradução é, de modo geral, semelhante em células eucarióticas e em células bacterianas; a maioria das diferenças significativas estão no número de componentes envolvidos e em detalhes do seu mecanismo. O processo de iniciação em eucariotos está es-

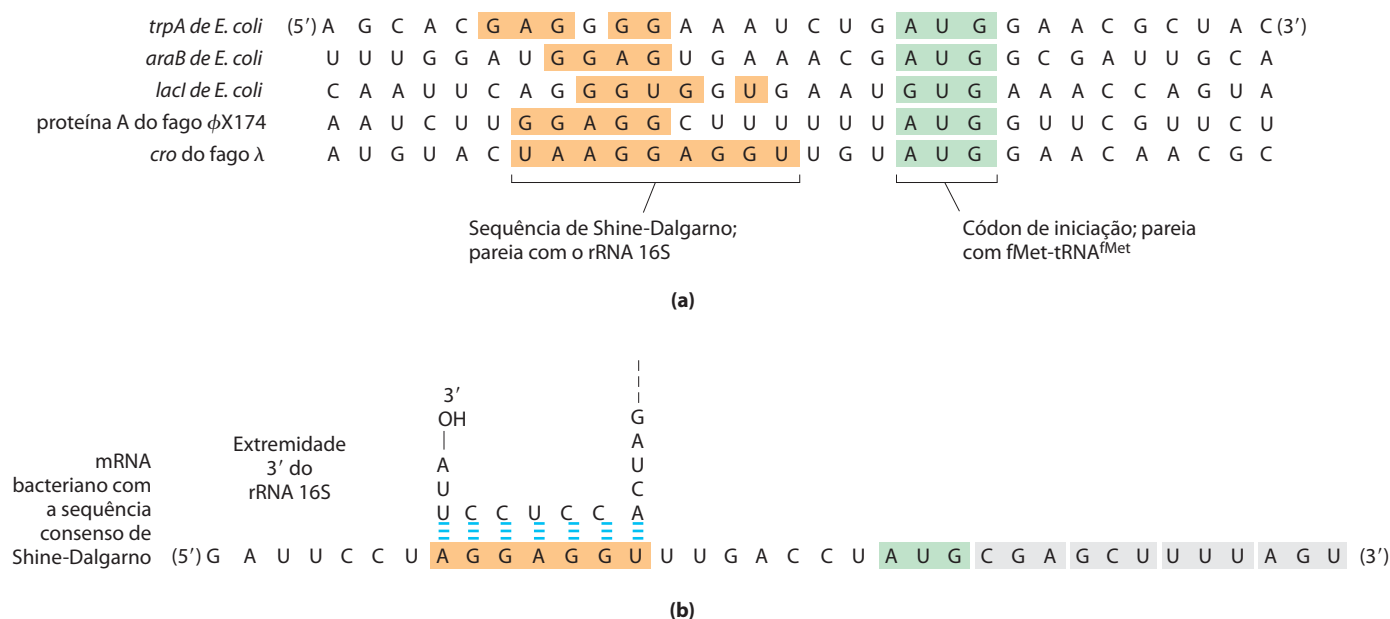



**FIGURA 27-26 Sequências do RNA mensageiro que servem como sinais para iniciar a síntese proteica nas bactérias. (a)** O alinhamento do AUG iniciador (mostrado em verde) no seu local correto na subunidade 30S do ribossomo depende, em parte, das sequências de Shine-Dalgarno situadas a montante (em bege). Porções do transcrito de mRNA de cinco genes bacterianos são mostradas. Observe o raro exemplo da proteína LacI de *E. coli*, que inicia com o códon GUG (Val) (ver Quadro 27-1). Em *E. coli*, AUG é o códon de iniciação em cerca de 91% dos genes, com GUG (7%) e UUG (2%) assumindo essa função mais raramente. **(b)** A sequência de Shine--Dalgarno do mRNA pareia com uma sequência próxima da extremidade 3′ do rRNA 16S.

quematizado na **Figura 27-27**. O mRNA de eucariotos se liga ao ribossomo formando um complexo com várias proteínas ligantes específicas. As células eucarióticas têm pelo menos 12 fatores de iniciação. Os fatores de iniciação eIF1A e eIF3 são homólogos funcionais do IF-1 e IF-3 de bactérias, ligando-se à subunidade 40S na etapa ❶, bloqueando a ligação do tRNA ao sítio A e o acoplamento prematuro da subunidade maior com a subunidade menor do ribossomo, respectivamente. O fator eIF1 liga-se ao sítio E. O tRNA iniciador carregado liga-se ao eIF2, o qual também está ligado a um GTP. Na etapa ❷, esse complexo ternário liga-se à subunidade ribossomal 40S, junto com outras duas proteínas envolvidas em etapas posteriores, eIF5 (que não está mostrada na Figura 27-27) e eIF5B. Esses componentes formam o complexo de preiniciação 43S. O mRNA liga-se ao complexo eIF4F o qual, na etapa ❸, é o intermediário na sua associação com o complexo de preiniciação 43S. O complexo eIF4F é formado pelo eIF4E (ligando o quepe 5′), eIF4A (com atividade ATPase e RNA-helicase) e eIF4G (uma proteína ligadora). A proteína eIF4G liga-se ao eIF3 e ao eIF4E, estabelecendo a primeira ligação entre o complexo de preiniciação 43S e o mRNA. O eIF4G também se liga à proteína ligadora da cauda poli-A (PABP, de *poly(a) binding protein*) na extremidade 3′ do mRNA, circularizando o mRNA (**Figura 27-28**) e facilitando a regulação traducional da expressão gênica, como descrito no Capítulo 28.

A ligação do mRNA e dos fatores a ele associados cria o complexo 48S. Esse complexo escaneia o mRNA, iniciando no quepe 5′ até que seja encontrado um códon AUG. Esse processo de escaneamento ou varredura (etapa ❹ da Figura 27-27) é facilitado pela atividade de RNA-helicase do eIF4A e por um outro fator (eIF4B, que não aparece na Figura 27-27), cuja atividade molecular exata ainda não é conhecida.

Uma vez encontrado o local onde está o AUG iniciador, ocorre associação da subunidade ribossomal 60S com o complexo na etapa ❺ e liberação de muitos fatores de iniciação. Isso requer ação do eIF5 e do eIF5B. A proteína eIF5 promove a atividade GTPase do eIF2, produzindo um complexo eIF2-GDP com afinidade reduzida pelo tRNA iniciador. A proteína eIF5B é homóloga à IF-2 de bactérias. Ela hidrolisa o GTP que está ligado a ela e dispara a dissociação do eIF2-GDP de outros fatores de iniciação, e em seguida ocorre a associação da subunidade 60S. Assim se completa a formação do complexo de iniciação.

Os papéis dos vários fatores de iniciação de bactérias e de eucariotos no processo como um todo estão resumidos na Tabela 27-8. O mecanismo pelo qual essas proteínas agem constitui uma importante área de pesquisa.

## Estágio 3: As ligações peptídicas são formadas no estágio de alongamento

A terceira etapa da síntese proteica é o **alongamento**. Outra vez, primeiramente serão analisadas as células bacterianas. O alongamento requer (1) o complexo de iniciação descrito anteriormente, (2) aminoacil-tRNA, (3) um conjunto de três proteínas citosólicas solúveis chamadas de **fatores de alongamento** (EF-Tu, EF-Ts e EF-G nas bactérias) e (4) GTP. As células realizam três etapas para adicionar cada

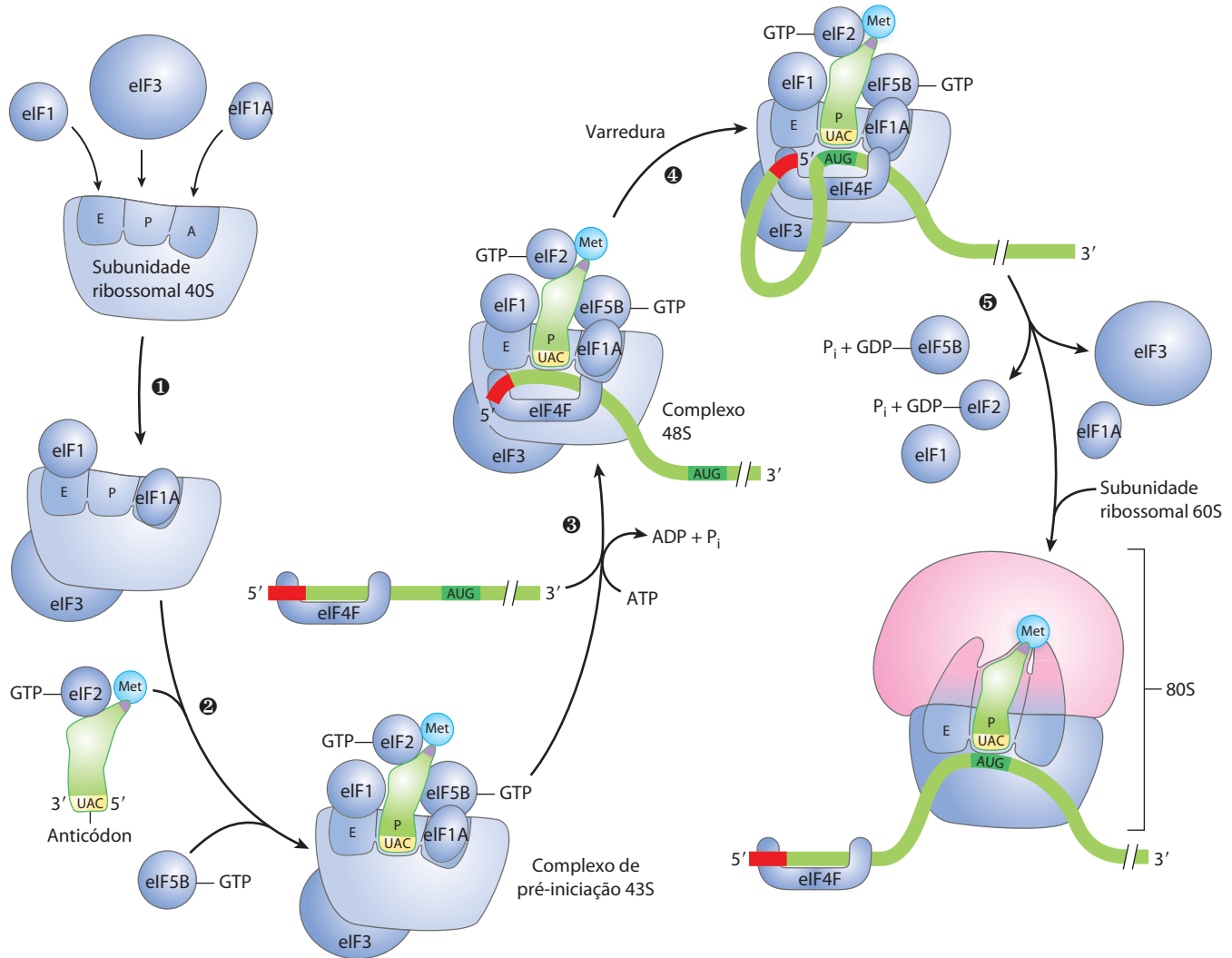



**FIGURA 27-27 O início da síntese proteica em eucariotos.** As cinco etapas são descritas no texto. Os fatores de iniciação eucarióticos medeiam a associação primeiramente do tRNA iniciador carregado para formar um complexo 43S e depois do mRNA (com o quepe 5′ mostrado em vermelho) para formar um complexo 48S. O complexo de iniciação final é formado quando a subunidade 60S se associa, ao mesmo tempo em que ocorre a liberação da maioria dos fatores de iniciação.

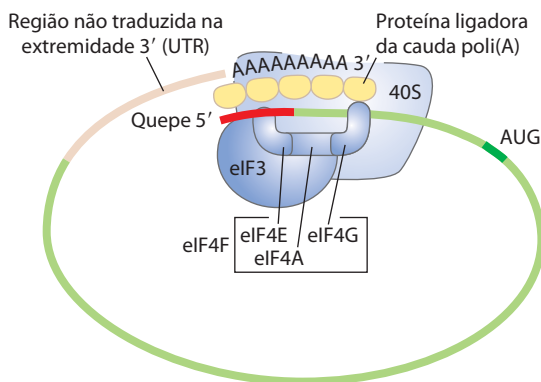



**FIGURA 27-28 Circularização do mRNA no complexo de iniciação em eucariotos.** As extremidades 3′ e 5′ dos mRNAs de eucariotos são unidas pelo complexo proteico eIF4F. A subunidade eIF4E liga-se ao quepe 5′, e a proteína eIF4G liga-se à proteína ligadora da cauda poli(A) (PABP) na extremidade 3′ do mRNA. A proteína eIF4G também se liga ao eIF3, unindo o mRNA circularizado à subunidade 40S do ribossomo.

resíduo de aminoácido, e essas etapas são repetidas enquanto houverem resíduos a ser adicionados.

**Etapa 1 do alongamento: Ligação de um aminoacil-tRNA** Na primeira etapa do ciclo de alongamento (**Figura 27-29**), o aminoacil-tRNA apropriado que entra se liga a um complexo que consiste em EF-Tu ligado a GTP. O complexo aminoacil-tRNA–EF-Tu–GTP resultante se liga ao sítio A do complexo de iniciação 70S. O GTP é hidrolisado, e um complexo EF-Tu–GDP é liberado do ribossomo 70S. O complexo EF-Tu–GTP é regenerado durante um processo envolvendo EF-Ts e GTP.

**Etapa 2 do alongamento: Formação da ligação peptídica** Uma ligação peptídica é agora formada entre os dois aminoácidos ligados, por meio dos seus tRNAs, aos sítios A e P no ribossomo. Isso ocorre por meio da transferência do grupo *N*-formilmetionil do tRNA iniciador para o grupo amino do segundo aminoácido, agora no sítio A (**Figura 27-30**). O

**TABELA 27-8** Fatores proteicos necessários para a iniciação da tradução em células bacterianas e eucarióticas

| Fator | Função |
|---|---|
| **Bactérias** | |
| IF-1 | Impede a ligação prematura do tRNA no sítio A |
| IF-2 | Facilita a ligação do fMet-$tRNA^{fMet}$ à subunidade 30S do ribossomo |
| IF-3 | Liga-se à subunidade 30S; impede a associação prematura da subunidade 50S; aumenta a especificidade do sítio P pelo fMet-$tRNA^{fMet}$ |
| **Eucariotos** | |
| eIF1 | Liga-se ao sítio E da subunidade 40S; facilita a interação entre o complexo ternário eIF2-tRNA-GTP e a subunidade 40S |
| eIF1A | Homólogo ao IF-1 de bactérias; impede a ligação prematura do tRNA no sítio A |
| eIF2 | GTPase; facilita a ligação do Met-$tRNA^{Met}$ iniciador à subunidade ribossomal 40S |
| eIF2B*, eIF3 | Primeiros fatores a se ligarem na subunidade 40S; facilitam as etapas subsequentes |
| eIF4F | Complexo que consiste em eIF4E, eIF4A e eIF4G |
| eIF4A | Atividade de RNA-helicase; remove estruturas secundárias do mRNA para permitir a ligação à subunidade 40S; faz parte do complexo eIF4F |
| eIF4B | Liga-se ao mRNA; facilita a varredura do mRNA para localizar o primeiro AUG |
| eIF4E | Liga-se ao quepe 5′ do mRNA; faz parte do complexo eIF4F |
| eIF4G | Liga-se ao eIF4E e à proteína ligante de poli(A) (PABP); faz parte do complexo eIF4F |
| eIF5* | Promove a dissociação de vários outros fatores de iniciação da subunidade 40S antes que ocorra a associação dessa com a subunidade 60S para formar o complexo de iniciação 80S |
| eIF5b | GTPase homóloga ao IF-2 de bactérias; promove a dissociação dos fatores de iniciação antes da montagem final do ribossomo |

* Não mostrados na Figura 27-27.

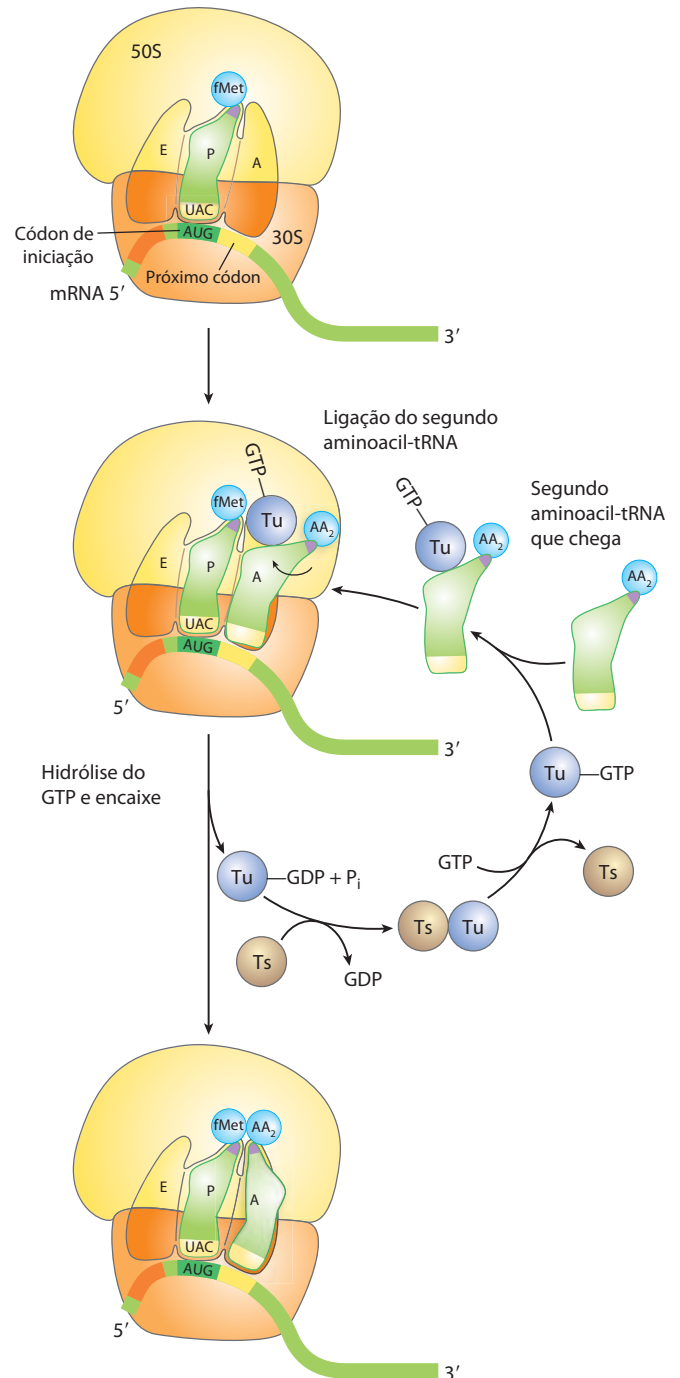



**FIGURA 27-29 Primeira etapa do alongamento em bactérias: ligação do segundo aminoacil-tRNA.** O segundo aminoacil-tRNA ($AA_2$) entra no sítio A do ribossomo ligado a EF-Tu, que está ligado a GTP (mostrado aqui como Tu), o qual também contém GTP. A ligação do segundo aminoacil--tRNA ao sítio A é acompanhada pela hidrólise de GTP a GDP e $P_i$ e liberação do complexo EF-Tu–GDP do ribossomo. O GDP ligado é liberado quando o complexo EF-Tu–GDP se liga ao EF-Ts, e o EF-Ts depois é liberado quando outra molécula de GTP se liga a EF-Tu. Isso recicla o EF-Tu, deixando-o disponível para repetir o ciclo. O encaixe envolve uma mudança na conformação do segundo tRNA, trazendo sua extremidade aminoacil para o sítio da peptidil-transferase.

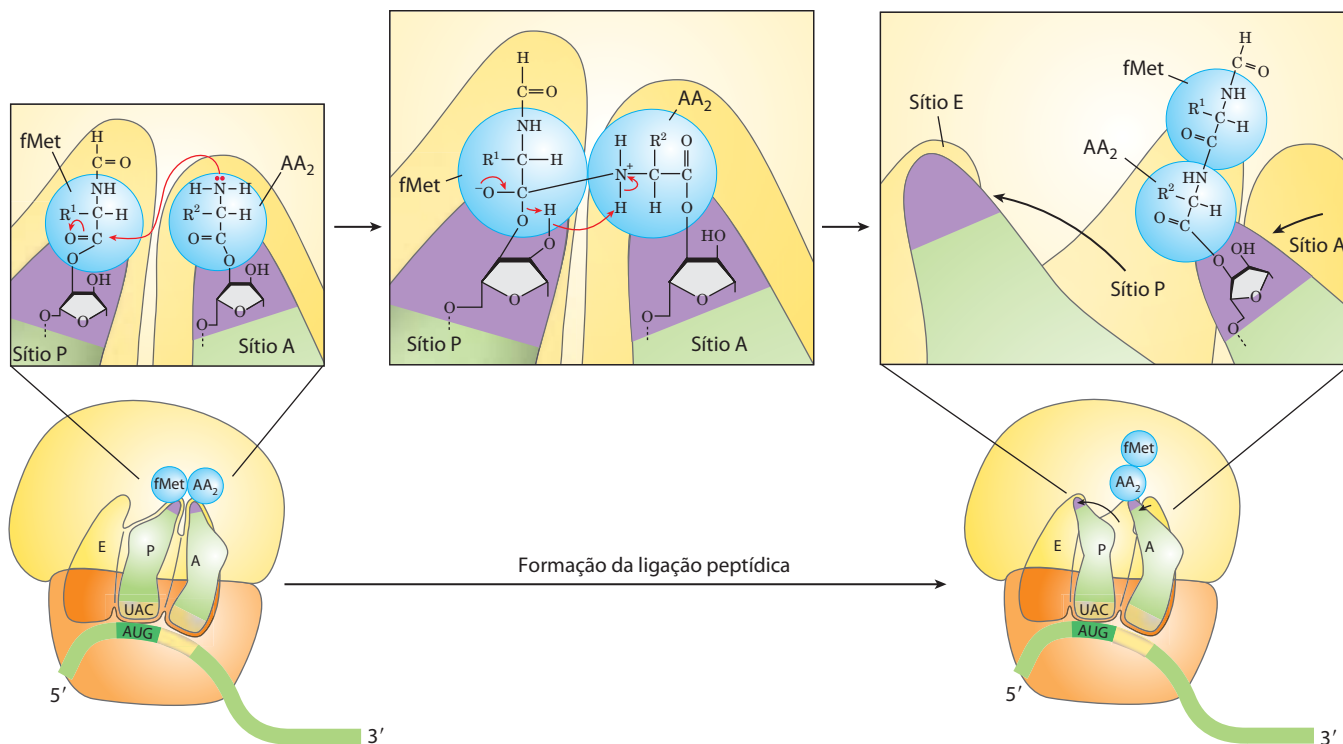



**FIGURA 27-30 Segunda etapa do alongamento em bactérias: formação da primeira ligação peptídica.** A peptidil-transferase que catalisa essa reação é a ribozima rRNA 23S. O grupo *N*-formilmetionil é transferido para o grupo amino do segundo aminoacil-tRNA no sítio A, formando um dipeptidil-tRNA. Nesse estágio, ambos os tRNAs ligados ao ribossomo mudam de posição na subunidade 50S, adotando um estado híbrido de ligação. O tRNA não carregado se desloca de modo que suas extremidades 3′ e 5′ ficam no sítio E. De forma semelhante, as extremidades 3′ e 5′ do peptidil-tRNA se deslocam para o sítio P. Os anticódons permanecem nos sítios P e A. Observe o envolvimento do grupamento 2′-hidroxila da adenosina da extremidade 3′ como um catalisador ácido-base geral nesta reação.

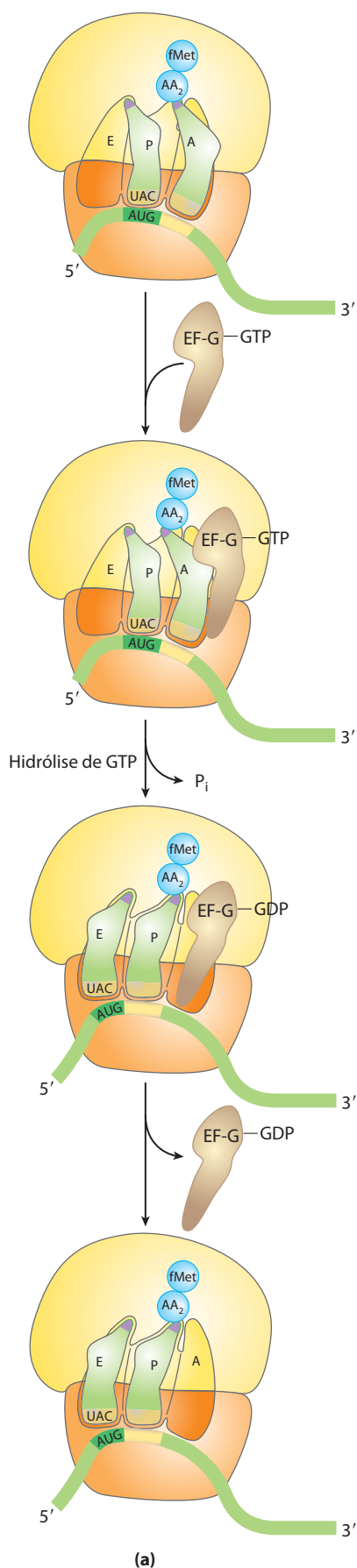
grupo $\alpha$-amino do aminoácido no sítio A age como um nucleófilo, deslocando o tRNA do sítio P para formar a ligação peptídica. Essa reação produz um dipeptidil-tRNA no sítio A, e o $tRNA^{fMet}$ "não carregado" (desacilado) permanece ligado ao sítio P. Os tRNA mudam então para um estado híbrido de ligação, com elementos de cada um deles estendendo-se sobre dois sítios diferentes no ribossomo, como mostrado na Figura 27-30.

A atividade enzimática que catalisa a formação da ligação peptídica tem sido historicamente chamada de **peptidil-transferase** e era considerada intrínseca a uma ou mais proteínas da subunidade maior do ribossomo. Agora sabe-se que essa reação é catalisada pelo rRNA 23S, contribuindo para o conhecido repertório catalítico das ribozimas. Essa descoberta apresenta implicações interessantes para a evolução da vida (ver Quadro 27-2).

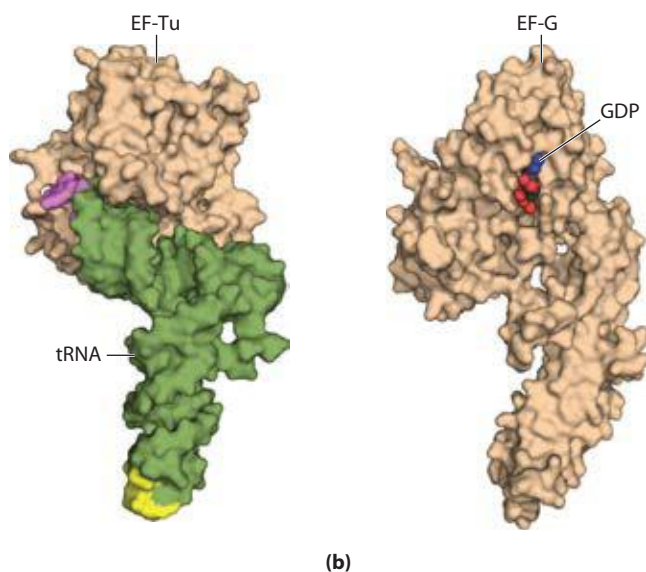
**Etapa 3 do alongamento: Translocação** Na etapa final do ciclo de alongamento, a **translocação**, o ribossomo se move um códon em direção à extremidade 3′ do mRNA (**Figura 27-31a**). Esse movimento move o anticódon do dipeptidil-tRNA, o qual ainda está preso ao segundo códon do mRNA, do sítio A para o sítio P, e move o tRNA desacilado do sítio P para o sítio E, a partir do qual o tRNA é liberado para o citosol. O terceiro códon do mRNA se encontra agora no sítio A e o segundo códon no sítio P. O movimento do ribossomo ao longo do mRNA requer o fator EF-G (também conhecido como translocase) e a energia fornecida pela hidrólise de outra molécula de GTP. Uma mudança na conformação tridimensional de todo o ribossomo resulta no movimento desse ao longo do mRNA. Como a estrutura do EF-G se assemelha à estrutura do complexo EF-Tu–tRNA (Figura 27-31b), o EF-G é capaz de se ligar ao sítio A e, presumivelmente, deslocar o peptidil-tRNA.

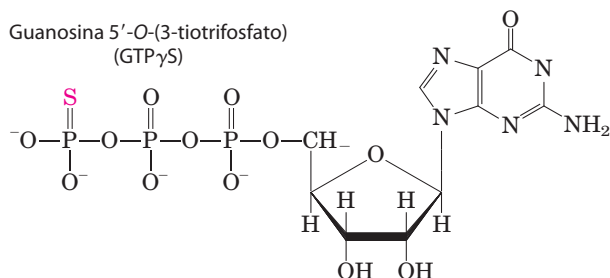
Após a translocação, o ribossomo, com o dipeptidil-tRNA e o mRNA ligados, está pronto para um novo ciclo de alongamento e para a ligação de um terceiro resíduo de aminoácido. Esse processo ocorre da mesma forma que a adição do segundo resíduo (como mostrado nas Figuras 27-29, 27-30 e 27-31). Para cada resíduo de aminoácido corretamente adicionado ao polipeptídeo nascente, dois GTPs são hidrolisados a GDP e $P_i$, à medida que o ribossomo se move códon a códon ao longo do mRNA em direção à extremidade 3′.

O polipeptídeo permanece ligado ao tRNA do último (mais recentemente) aminoácido inserido. Essa associação mantém a conexão funcional entre a informação contida no mRNA e a produção do polipeptídeo decodificado. Ao mesmo tempo, a ligação éster entre esse tRNA e a extremidade carboxil do polipeptídeo nascente ativa o grupo carboxiterminal para o ataque nucleofílico pelo aminoácido que chega para formar uma nova ligação peptídica (Figura 27-30). À medida que a ligação éster existente entre o polipeptídeo e o tRNA é quebrada durante a formação da ligação pepti-

dica, a ligação entre o polipeptídeo e a informação contida no mRNA persiste, pois cada novo aminoácido adicionado permanece preso ao seu tRNA.

O ciclo de alongamento em eucariotos é bastante semelhante ao que ocorre em bactérias. Três fatores de alongamento eucarióticos (eEF1$\alpha$, eEF1$\beta\gamma$ e eEF2) têm funções análogas àquelas dos fatores de alongamento bacterianos (EF-Tu, EF-Ts e EF-G, respectivamente). Os ribossomos eucarióticos não têm um sítio E; os tRNAs não carregados são expulsos diretamente do sítio P.

**Edição no ribossomo** A atividade GTPásica do EF-Tu durante a primeira etapa do alongamento em células bacterianas (Figura 27-29) contribui de maneira importante para a velocidade e a fidelidade de todo o processo biossintético. Tanto o complexo EF-Tu–GTP como o EF-Tu–GDP existem por poucos milissegundos antes de se dissociarem. Esses períodos de tempo constituem oportunidades para que ocorra uma leitura para edição das interações códon-anticódon. Os aminoacil-tRNA incorretos normalmente se dissociam do sítio A em um desses momentos. Se o análogo de GTP guanosina 5′-*O*-(3-tiotrifosfato) (GTP$\gamma$S) for utilizado no lugar do GTP, a hidrólise se torna mais lenta, melhoran-

**FIGURA 27-31 Terceira etapa do alongamento em bactérias: translocação. (a)** O ribossomo se move a distância de um códon em direção à extremidade 3′ do mRNA, utilizando a energia proveniente da hidrólise do GTP ligado ao fator EF-G (translocase). O dipeptidil-tRNA está agora totalmente no sítio P, deixando o sítio A aberto para a entrada do próximo (terceiro) aminoacil-tRNA. O tRNA não carregado se dissocia, depois, do sítio E, e o ciclo de alongamento inicia novamente. **(b)** A estrutura do EF-G se assemelha à estrutura do EF-Tu complexado com tRNA. Mostrados aqui estão (à esquerda) o EF-Tu em complexo com o tRNA (PDB ID 1B23) e (à direita) o EF-G em complexo com GDP (PDB ID 1DAR). A região carboxiterminal do EF-G se assemelha, estruturalmente, à alça do anticódon do tRNA, tanto em forma como em distribuição de cargas.

do a fidelidade (aumentando os intervalos de edição), mas reduzindo a velocidade da síntese proteica.

Guanosina 5′-*O*-(3-tiotrifosfato)
(GTPγS)

O processo de síntese proteica (incluindo as características do pareamento códon-anticódon já descritas) foi claramente otimizado ao longo da evolução, de forma a equilibrar as exigências de rapidez e fidelidade. Maior fidelidade diminui a velocidade, enquanto aumentos na velocidade provavelmente comprometeriam a fidelidade. E lembre-se que o mecanismo de edição no ribossomo estabelece apenas que ocorreu pareamento apropriado entre códon e anticódon e não verifica se o aminoácido correto está ligado ao tRNA. Se um tRNA for aminoacilado com sucesso com um aminoácido errado (o que se pode fazer experimentalmente), esse aminoácido incorreto é de maneira eficiente incorporado à proteína em resposta a qualquer códon que seja reconhecido normalmente por aquele tRNA.

## Estágio 4: A terminação da síntese de polipeptídeos requer um sinal especial

O alongamento continua até que o ribossomo adicione o último aminoácido codificado pelo mRNA. A **terminação**, quarto estágio da síntese de polipeptídeos, é sinalizada pela presença de um dos três códons de parada no mRNA (UAA, UAG, UGA), imediatamente após o último aminoácido codificado. Mutações no anticódon do tRNA que permitem que um aminoácido seja inserido em um códon de parada são geralmente deletérias para a célula (Quadro 27-4). Em bactérias, uma vez que um códon de parada tenha ocupado o sítio A do ribossomo, três **fatores de terminação**, ou **fatores de liberação** – as proteínas RF-1, RF-2 e RF-3 –, contribuem para (1) hidrólise da ligação peptidil-tRNA terminal; (2) liberação do polipeptídeo e do último tRNA, agora não carregado, do sítio P, e (3) dissociação do ribossomo 70S em suas subunidades 30S e 50S, prontas para começar um novo ciclo de síntese de polipeptídeo (**Figura 27-32**). O RF-1 reconhece os códons de parada UAG e UAA, e o RF-2 reconhece UGA e UAA. O RF-1 ou o RF-2 (dependendo do códon presente) se liga a um códon de parada e induz a peptidil-transferase a transferir o polipeptídeo nascente para uma molécula de água em vez de para outro aminoácido. Os fatores de liberação têm domínios que parecem assemelhar-se à estrutura do tRNA, como mostrado para o fator de alongamento EF-G na Figura 27-31b. A função es-

### QUADRO 27-4 Variação induzida do código genético: supressão sem sentido

Quando uma mutação produz um códon de parada no interior de um gene, a tradução é prematuramente interrompida, e o polipeptídeo incompleto é, geralmente, inativo. Essas mutações são chamadas de mutações sem sentido. O gene pode ter sua função normal recuperada se uma segunda mutação (1) converter o códon de parada resultante da primeira mutação em um códon que especifique um aminoácido ou (2) suprimir os efeitos do códon de terminação. Essas mutações restauradoras são chamadas de **supressores sem sentido**; elas geralmente envolvem mutações em genes de tRNA para produzir tRNAs alterados (supressores) capazes de reconhecer o códon de parada e inserir um aminoácido naquela posição. A maioria dos tRNAs supressores conhecidos apresentam substituições de uma única base nos seus anticódons.

Os tRNAs supressores constituem uma variação experimentalmente induzida do código genético para permitir a leitura de códons que são, geralmente, de terminação, de forma bem parecida com as variações de código que ocorrem naturalmente, conforme descrito no Quadro 27-1. A supressão sem sentido não quebra totalmente a transferência normal de informação na célula, pois a célula geralmente tem várias cópias de cada gene de tRNA; alguns desses genes duplicados são pouco expressos e contribuem apenas para uma pequena fração do conjunto de um determinado tRNA na célula. As mutações supressoras, em geral, envolvem um tRNA "menos importante", deixando os tRNAs principais para que o códon seja lido normalmente.

Por exemplo, a *E. coli* tem três genes idênticos para $tRNA^{Tyr}$, sendo que cada um produz um tRNA com o anticódon (5′)GUA. Um desses genes é expresso em níveis relativamente altos, e, portanto, o seu produto representa a principal fração de $tRNA^{Tyr}$; os outros dois genes são transcritos em quantidades pequenas. Uma mudança no anticódon do tRNA produzido a partir de um desses dois genes de $tRNA^{Tyr}$, de (5′)GUA para (5′)CUA, produz, em baixas quantidades, um tipo de $tRNA^{Tyr}$ que irá inserir tirosina em códons de parada UAG. Essa inserção de tirosina em UAG é realizada de maneira pouco eficiente, mas pode produzir quantidades suficientes da proteína inteira, a partir de um gene com mutação sem sentido, de modo a permitir que a célula sobreviva. O $tRNA^{Tyr}$ majoritário continua traduzindo o código genético normalmente para a maioria das proteínas.

A mutação que leva à geração de um tRNA supressor nem sempre ocorre no anticódon. A supressão de códons UGA sem sentido geralmente envolve o $tRNA^{Trp}$ que reconhece, normalmente, UGG. A alteração que permite que ele leia UGA (e insira resíduos de Trp nessas posições) é uma mudança de G para A na posição 24 (em um braço do tRNA ligeiramente afastado do anticódon); esse tRNA pode agora reconhecer *tanto* UGG *como* UGA. Uma mudança semelhante é encontrada em tRNAs envolvidos na variação de código genético mais comumente encontrada na natureza (UGA = Trp; ver Quadro 27-1).

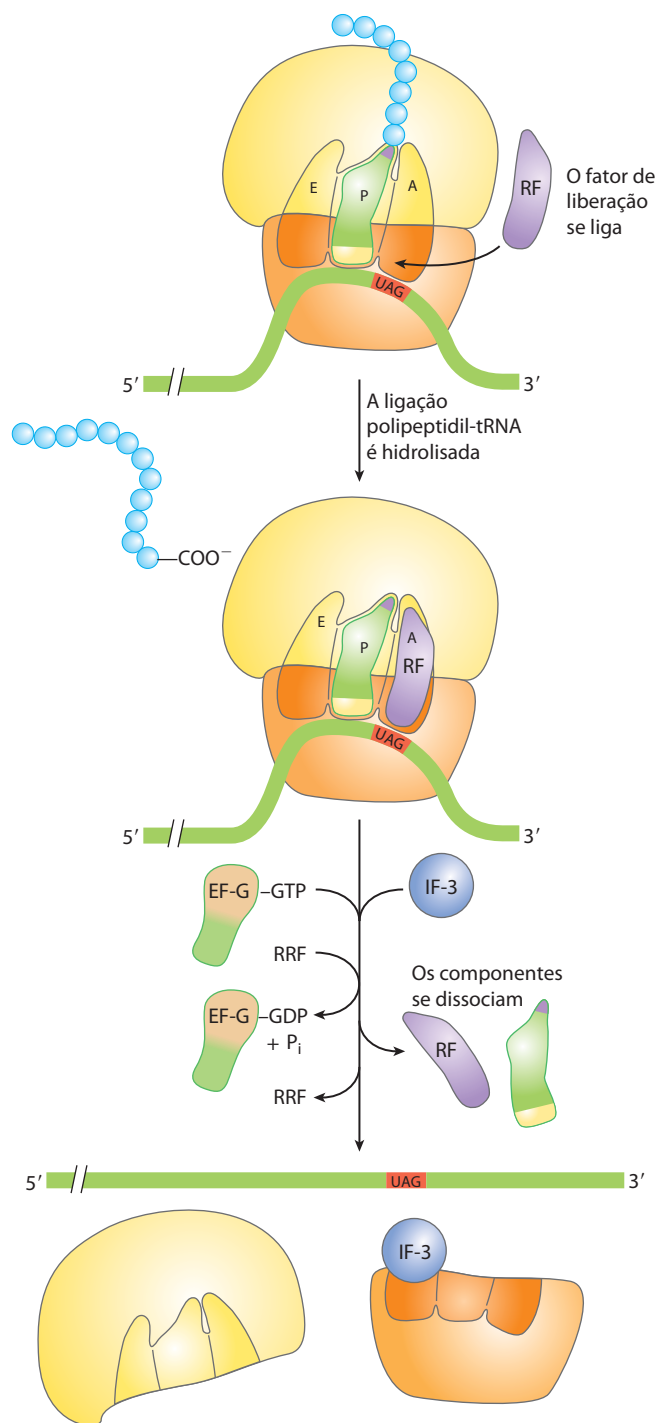



**FIGURA 27-32 Terminação da síntese de proteínas em bactérias.** A terminação ocorre em resposta a um códon de parada no sítio A. Primeiro, um fator de liberação, RF (RF-1 ou RF-2, dependendo do códon de parada presente), liga-se ao sítio A. Isso causa a hidrólise da ligação éster entre o polipeptídeo nascente e o tRNA no sítio P e a liberação do polipeptídeo completo. Finalmente, o mRNA, o tRNA desacilado e o fator de liberação saem do ribossomo, o qual se dissocia em suas subunidades 30S e 50S, auxiliado pelo fator de reciclagem do ribossomo (RRF), pelo IF-3 e pela energia fornecida pela hidrólise de GTP mediada por EF-G. O complexo formado pela subunidade 30S e pelo IF-3 está pronto para iniciar um outro ciclo de tradução (ver Figura 27-25).

pecífica do RF-3 ainda não foi definitivamente estabelecida, mas acredita-se que ele libera a subunidade ribossomal. Em eucariotos, um único fator de liberação, o eRF, reconhece todos os três códons de parada.

A reciclagem do ribossomo leva à dissociação dos componentes envolvidos na tradução. Os fatores de liberação se dissociam do complexo resultante da parada (contendo um tRNA não carregado no sítio P) e são substituídos pelo EF-G e por uma proteína denominada fator de reciclagem do ribossomo (RRF, de *ribosome recycling factor*; $M_r$ 20.300). A hidrólise do GTP pelo EF-G leva à dissociação da subunidade 50S, que se separa do complexo 30S tRNA–mRNA. O EF-G e o RRF são substituídos por IF-3, o qual promove a dissociação do tRNA. O mRNA é então liberado. O complexo formado entre o IF-3 e a subunidade 30S está então pronto para iniciar outro ciclo de síntese proteica (Figura 27-25).

**Custo energético da fidelidade na síntese proteica** A síntese de uma proteína fiel à informação especificada pelo seu respectivo mRNA requer energia. A formação de cada aminoacil-tRNA utiliza dois grupos fosfato de alta energia. Um ATP adicional é consumido cada vez que um aminoácido incorretamente ativado é hidrolisado pela atividade desacilase de uma aminoacil-tRNA-sintase, como parte de sua atividade de edição. Um GTP é clivado em GDP e $P_i$ durante a primeira etapa de alongamento, e outro durante a etapa de translocação. Assim, para a formação de cada ligação peptídica em um polipeptídeo, é necessária, em média, a energia derivada da hidrólise de mais de quatro NTPs gerando NDPS.

Isso representa um "empurrão" termodinâmico excessivamente grande na direção da síntese: pelo menos 4 × 30,5 kJ/mol = 122 kJ/mol de energia de ligação fosfodiéster para gerar uma ligação peptídica, a qual tem uma energia livre padrão de hidrólise de apenas aproximadamente –21 kJ/mol. A variação de energia livre durante a síntese de uma ligação peptídica, portanto, tem valor líquido de – 101 kJ/mol. As proteínas são polímeros que contêm informação. O objetivo bioquímico não é apenas a formação de uma ligação peptídica, mas a formação de uma ligação peptídica entre dois aminoácidos *específicos*. Cada um dos compostos fosfatados altamente energéticos gastos nesse processo têm papel fundamental na manutenção do alinhamento correto entre cada novo códon no mRNA e o seu respectivo aminoácido na extremidade crescente do polipeptídeo. Essa energia permite uma altíssima fidelidade na tradução biológica da mensagem genética do mRNA para a sequência de aminoácidos das proteínas.

**Tradução rápida de uma única mensagem pelos polissomos** Grandes conjuntos de 10 a 100 ribossomos muito ativos na síntese proteica podem ser isolados de células eucarióticas e bacterianas. Micrografias eletrônicas mostram a presença de uma fibra entre ribossomos adjacentes em um conjunto, o qual é chamado de **polissomo** (**Figura 27-33a**). A fita conectora é uma única molécula de mRNA que está sendo traduzida simultaneamente por ribossomos muito próximos uns dos outros, permitindo um uso altamente eficiente do mRNA.

Em bactérias, a transcrição e a tradução são processos estreitamente acoplados. Os RNAs mensageiros são sintetizados e traduzidos na mesma direção 5′→3′. Os ribossomos começam a traduzir a extremidade 5′ do mRNA antes

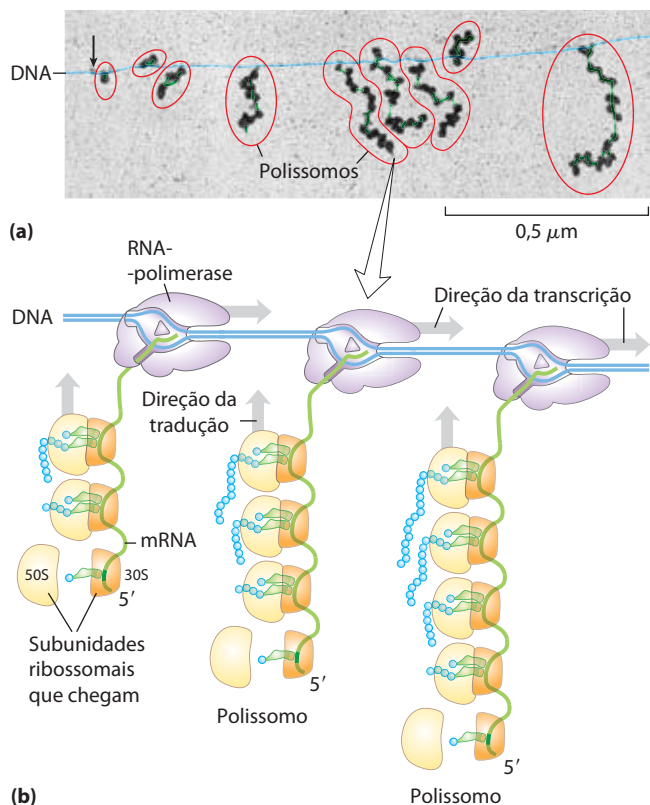



**FIGURA 27-33 Acoplamento da transcrição e da traduação em bactérias. (a)** Micrografia eletrônica de polissomos que se formam durante a transcrição de um segmento de DNA de *E. coli*. Cada molécula de mRNA está sendo traduzida por muitos ribossomos simultaneamente. As cadeias polipeptídicas nascentes que são formadas nos ribossomos são difíceis de visualizar devido às condições sob as quais as amostras mostradas nessas micrografias eletrônicas são preparadas. A seta aponta o local aproximado do início do gene que está sendo transcrito. **(b)** Cada mRNA é traduzido pelos ribossomos enquanto ainda está sendo transcrito do DNA pela RNA-polimerase. Isso é possível porque, em bactérias, o mRNA não precisa ser transportado do núcleo para o citoplasma para que encontre os ribossomos. Neste diagrama, os ribossomos são mostrados em tamanho menor do que a RNA-polimerase. Na verdade o tamanho do ribossomo ($M_r$ 2,7 × $10^6$) é uma ordem de magnitude maior do que o tamanho da RNA-polimerase ($M_r$ 3,9 × $10^5$).

que a transcrição tenha sido completada (Figura 27-33b). A situação é um tanto diferente em células eucarióticas, nas quais os mRNAs recém-sintetizados precisam deixar o núcleo antes que possam ser traduzidos.

Em geral, os mRNAs bacterianos existem por apenas alguns minutos (p. 1084) antes de serem degradados por nucleases. Para manter altas taxas de síntese proteica, o mRNA para uma dada proteína ou grupo de proteínas precisa ser sintetizado continuamente e traduzido com eficiência máxima. O curto tempo de vida dos mRNAs nas bactérias permite a parada rápida da síntese quando a proteína não é mais necessária.

## Estágio 5: As cadeias polipeptídicas recém-sintetizadas sofrem enovelamento e processamento

Na etapa final da síntese proteica, a cadeia polipeptídica nascente é dobrada e processada, adquirindo sua forma biologicamente ativa. Durante ou após a sua síntese, o polipeptídeo assume, progressivamente, sua conformação nativa, com a formação de interações/ligações apropriadas, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, iônicas e de van der Waals. Dessa forma, a informação genética linear, ou unidimensional, contida no mRNA é convertida na estrutura tridimensional da proteína. Algumas proteínas recém-sintetizadas, sejam elas de bactérias, arqueias ou eucariotos, não adquirem sua conformação final biologicamente ativa até que sejam alteradas por uma ou mais reações de processamento, denominadas **modificações pós-traducionais**.

**Modificações aminoterminais e carboxiterminais** O primeiro resíduo inserido em todos os polipeptídeos é a *N*-formilmetionina (em bactérias) ou metionina (em eucariotos). Entretanto, o grupo formil, o resíduo Met aminoterminal e, frequentemente, resíduos adicionais da região aminoterminal (e, em alguns casos, da extremidade carboxil) podem ser removidos enzimaticamente para a formação da proteína funcional final. Em até 50% das proteínas eucarióticas, o grupamento amino do resíduo aminoterminal é *N*-acetilado após a tradução. Às vezes, resíduos carboxiterminais são também modificados.

**Perda das sequências sinalizadoras** Como será visto na Seção 27.3, 15 a 30 resíduos da extremidade aminoterminal de algumas proteínas têm papel no endereçamento da proteína para seu destino final na célula. Essas **sequências sinalizadoras** são removidas no final por peptidases específicas.

**Modificação de aminoácidos individuais** Os grupos hidroxila de certos resíduos Ser, Thr e Tyr de algumas proteínas são enzimaticamente fosforilados por ATP (**Figura 27-34a**); os grupos fosfato adicionam cargas negativas a esses polipeptídeos. O significado funcional dessa modificação varia de uma proteína para outra. Por exemplo, a proteína caseína do leite tem muitos grupos de fosfosserina que ligam $Ca^{2+}$. Cálcio, fosfato e aminoácidos são elementos valiosos para lactentes; a caseína fornece, assim, três nutrientes essenciais. E, como foi visto em vários exemplos, os ciclos de fosforilação-desfosforilação regulam a atividade de muitas enzimas e proteínas regulatórias.

Grupos carboxil extras podem ser adicionados a resíduos Glu de algumas proteínas. Por exemplo, a protrombina, proteína da coagulação sanguínea, contém vários resíduos de γ-carboxiglutamato (Figura 27-34b) na sua região aminoterminal, os quais são introduzidos por uma enzima que necessita de vitamina K. Esses grupos carboxil ligam $Ca^{2+}$, o qual é necessário para iniciar o mecanismo de coagulação.

Resíduos de monometil e dimetil-lisina (Figura 27-34c) ocorrem em algumas proteínas musculares e no citocromo *c*. A calmodulina da maioria dos organismos contém um resíduo de trimetil-lisina em uma posição específica. Em outras proteínas, os grupos carboxil de alguns resíduos Glu sofrem metilação, que remove suas cargas negativas.

**Ligação de cadeias laterais de carboidratos** As cadeias laterais de carboidratos das glicoproteínas são ligadas covalentemente durante ou após a síntese do polipeptídeo. Em algumas glicoproteínas, a cadeia lateral de carboidrato é ligada enzimaticamente a resíduos Asn (oligossacarídeos *N*-ligados); em outras, a resíduos Ser ou Thr (oligossacarídeos *O*-

(a)

Fosfosserina

Fosfotreonina

Fosfotirosina

(b)

γ-Carboxiglutamato

(c)

Metil-lisina

Dimetil-lisina

Trimetil-lisina

Metilglutamato

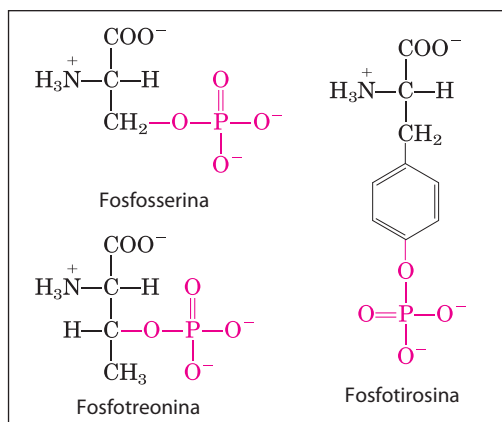
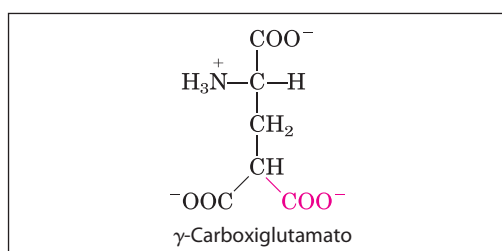
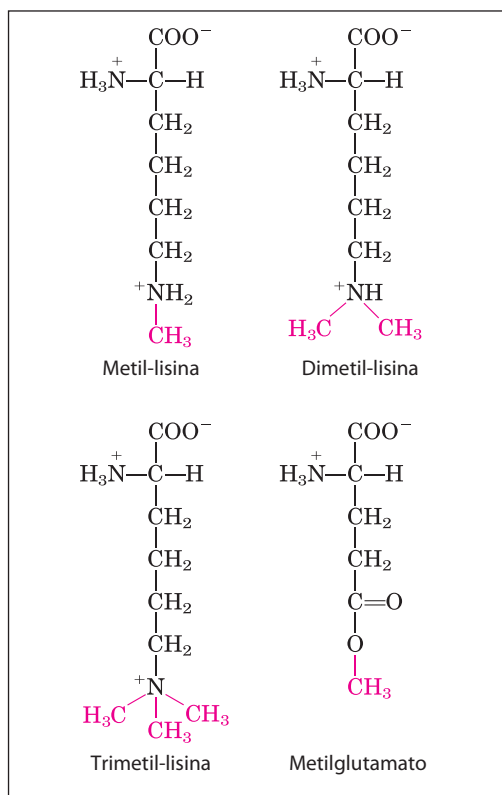



**FIGURA 27-34 Alguns resíduos de aminoácidos modificados. (a)** Aminoácidos fosforilados. **(b)** Aminoácido carboxilado. **(c)** Alguns aminoácidos metilados.

Farnesil-pirofosfato

Proteína Ras

Farnesil transferase

$PP_i$

Proteína Ras farnesilada

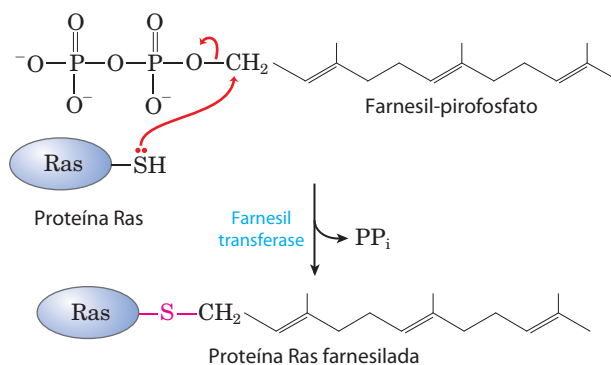



**FIGURA 27-35 Farnesilação de um resíduo Cys.** A ligação tioéter é mostrada em vermelho. A proteína Ras é o produto do oncogene *ras*.

-ligados) (ver a Figura 7-30). Muitas proteínas com função extracelular, bem como os proteoglicanos lubrificantes que revestem as membranas mucosas, contêm cadeias laterais de oligossacarídeos (ver Figura 7-28).

**Adição de grupos isoprenila** Várias proteínas eucarióticas são modificadas pela adição de grupos derivados do isopreno (grupos isoprenila). Uma ligação tioéter é formada entre o grupo isoprenila e um resíduo Cys da proteína (ver Figura 11-15). Os grupos isoprenila são derivados de intermediários pirofosforilados da via de biossíntese do colesterol (ver Figura 21-35), como o farnesil-pirofosfato (**Figura 27-35**). Proteínas assim modificadas incluem as proteínas Ras (pequenas proteínas G), que são produtos dos oncogenes e proto-oncogenes *ras*, as proteínas G triméricas (ambas discutidas no Capítulo 12), bem como as laminas, proteínas encontradas na matriz nuclear. O grupo isoprenila ajuda a ancorar a proteína na membrana. A atividade transformadora (carcinogênica) do oncogene *ras* é perdida quando a isoprenilação da proteína Ras é bloqueada, uma descoberta que tem estimulado interesse na identificação de inibidores dessa via de modificação pós-traducional para o uso na quimioterapia do câncer.

**Adição de grupos prostéticos** Muitas proteínas exigem, para sua atividade, grupos prostéticos ligados covalentemente. Dois exemplos são a molécula de biotina da acetil-CoA-carboxilase e o grupo heme da hemoglobina ou do citocromo *c*.

**Processamento proteolítico** Muitas proteínas são inicialmente sintetizadas como polipeptídeos precursores longos e inativos, os quais são clivados proteoliticamente para dar origem às formas menores e ativas das proteínas. Exemplos incluem a pró-insulina, algumas proteínas virais e proteases, como o quimotripsinogênio e o tripsinogênio (ver Figura 6-38).

**Formação de pontes dissulfeto** Após se dobrarem nas suas conformações nativas, algumas proteínas formam pontes dissulfeto entre resíduos de Cys presentes em uma mesma cadeia ou em cadeias diferentes. Nos eucariotos, as pontes dissulfeto são comuns em proteínas secretadas da célula. As pontes assim formadas ajudam a proteger a conformação nativa da molécula proteica da desnaturação no meio extracelular, que é geralmente oxidante e cujas condições podem ser bem diferentes daquelas do meio intracelular.

## A síntese proteica é inibida por muitos antibióticos e toxinas

A síntese proteica constitui uma função central na fisiologia celular e é o alvo principal de muitos antibióticos e toxinas naturais. A maioria desses antibióticos inibe a síntese proteica nas bactérias. As diferenças entre a síntese de proteínas em bactérias e em eucariotos, apesar de muito tênues em alguns casos, bastam para que a maioria dos compostos discutidos a seguir seja relativamente inofensiva para células eucarióticas. A seleção natural favoreceu a evolução de compostos que fazem uso de diferenças mínimas para afetar seletivamente os sistemas das bactérias, de forma que essas armas bioquímicas são sintetizadas por alguns microrganismos, sendo extremamente tóxicas para outros. Uma vez que quase todas as etapas da síntese proteica podem ser inibidas por um ou outro antibiótico, esses compostos têm se tornado ferramentas valiosas no estudo da biossíntese de proteínas.

A **puromicina**, produzida pelo fungo *Streptomyces alboniger*, é um dos mais bem conhecidos antibióticos inibidores da síntese proteica. A sua estrutura é bastante semelhante à extremidade 3′ de um aminoacil-tRNA, permitindo que ele se ligue ao sítio A do ribossomo e participe na formação da ligação peptídica, produzindo peptidil-puromicina (**Figura 27-36**). No entanto, por se assemelhar apenas à extremidade 3′ do tRNA, a puromicina não participa da translocação e se dissocia do ribossomo logo após se ligar à extremidade carboxil do peptídeo. Isso causa o término prematuro da síntese do polipeptídeo.

As **tetraciclinas** inibem a síntese proteica em bactérias por meio do bloqueio do sítio A do ribossomo, impedindo a ligação do aminoacil-tRNA. O **cloranfenicol** inibe a síntese proteica realizada nos ribossomos das bactérias (bem como das mitocôndrias e dos cloroplastos) pelo bloqueio da atividade peptidil-transferase; ele não afeta a síntese citosólica das proteínas em eucariotos. Por outro lado, a **cicloeximida** bloqueia a peptidil-transferase dos ribossomos 80S de eucariotos, mas não aquela dos ribossomos 70S das bactérias (nem das mitocôndrias nem dos cloroplastos). A **estreptomicina**, um trissacarídeo básico, causa uma leitura errada do código genético (em bactérias) em concentrações relativamente baixas e inibe a iniciação em concentrações mais altas.

Tetraciclina

Cloranfenicol

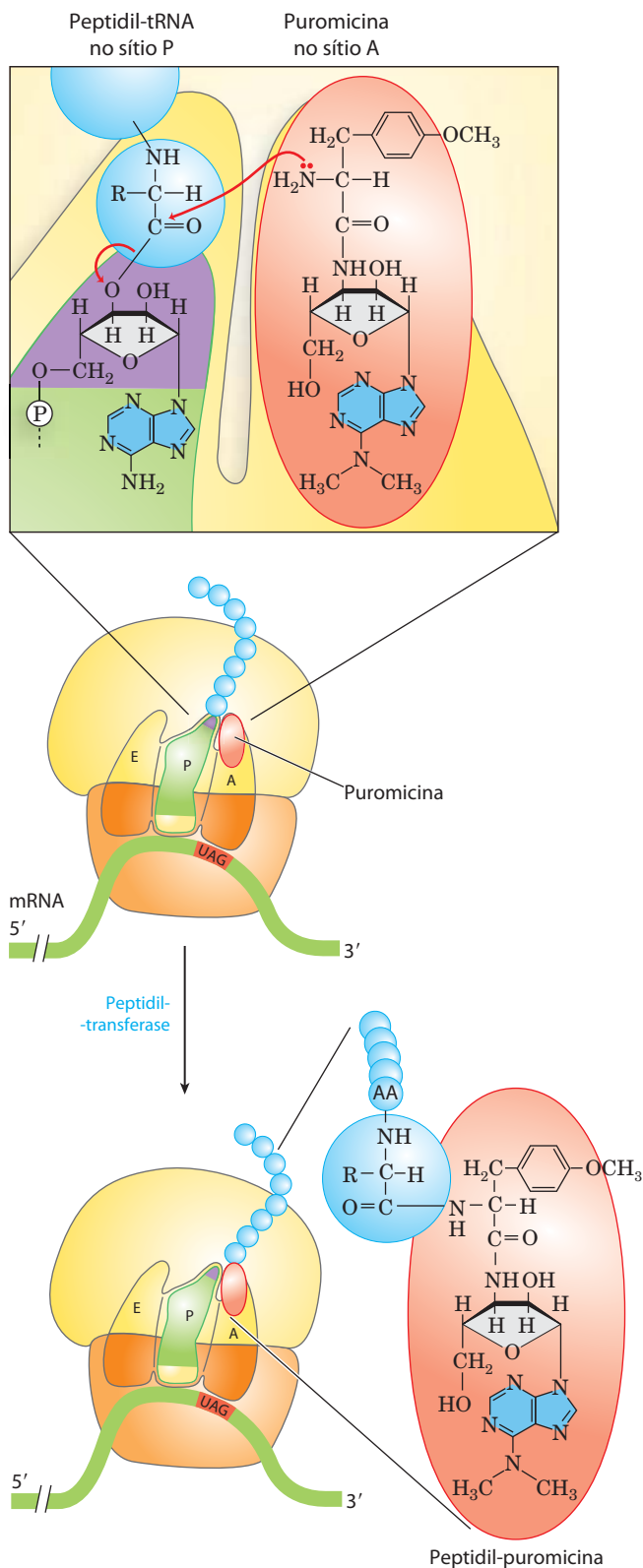
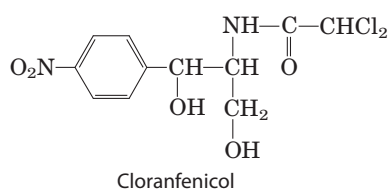
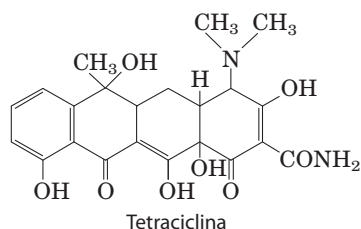
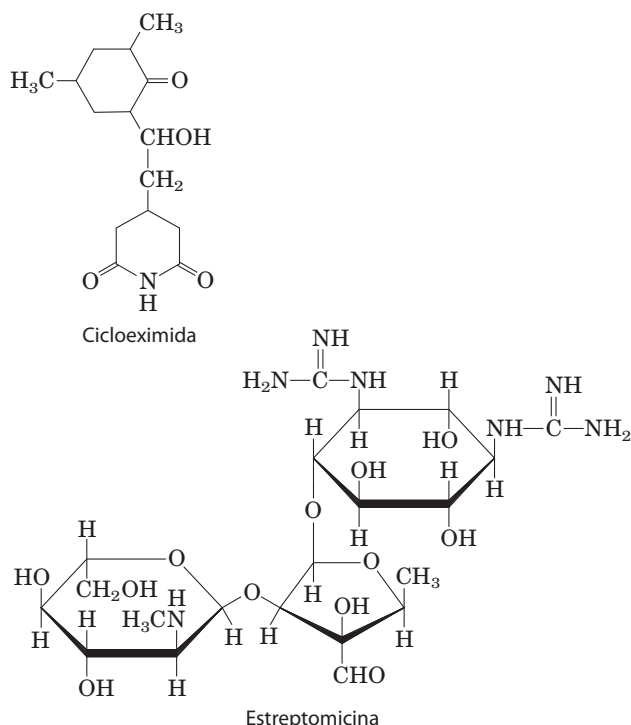



**FIGURA 27-36 Perturbação da formação da ligação peptídica pela puromicina.** O antibiótico puromicina é parecido com a extremidade aminoacil de um tRNA carregado, sendo capaz de se ligar ao sítio A do ribossomo e participar da formação da ligação peptídica. O produto dessa reação, a peptidil-puromicina, em vez de ser translocada para o sítio P dissocia-se do ribossomo, causando a terminação prematura da cadeia.

Cicloeximida

Estreptomicina

Vários outros inibidores da síntese proteica são notáveis em razão da sua toxicidade para humanos e outros mamíferos. A **toxina diftérica** ($M_r$ 58.330) catalisa a ADP-ribosilação de um resíduo de diftamida (histidina modificada) do fator de alongamento eucariótico eEF2, inativando-o. A **ricina** ($M_r$ 29.895), proteína extremamente tóxica da mamona, inativa a subunidade 60S dos ribossomos eucarióticos pela despurinação de uma adenosina específica no rRNA 23S. A ricina foi utilizada no infame caso de assassinato de um jornalista búlgaro da BBC, Georgi Markov, morto em 1978 presumivelmente pela polícia búlgara. Utilizando uma seringa escondida na extremidade de uma sombrinha, um membro da polícia secreta injetou um dispositivo contendo ricina na perna de Markov. Ele morreu 4 dias depois.

## RESUMO 27.2 A síntese proteica

- A síntese proteica ocorre nos ribossomos, que consistem em proteínas e rRNA. As bactérias têm ribossomos 70S, com uma subunidade maior (50S) e uma menor (30S). Os ribossomos eucarióticos são significativamente maiores (80S) e contêm mais proteínas.
- Os RNAs transportadores contêm entre 73 e 93 resíduos nucleotídicos, alguns dos quais têm bases modificadas. Cada tRNA tem o braço aminoacila com a sequência terminal CCA(3′) – à qual um aminoácido é esterificado –, o braço do anticódon, o braço T$\psi$C e o braço D; alguns tRNAs têm um quinto braço. O anticódon é responsável pela especificidade da interação entre o aminoacil-tRNA e o códon complementar do mRNA.
- O crescimento da cadeia dos polipeptídeos nos ribossomos inicia com o aminoácido aminoterminal e ocorre por adições sucessivas de novos resíduos à extremidade carboxil.
- A síntese proteica acontece em cinco estágios.

  **1.** Os aminoácidos são ativados no citosol por aminoacil-tRNA-sintetases específicas. Essas enzimas catalisam a formação de aminoacil-tRNA, com a clivagem simultânea de ATP, gerando AMP e $PP_i$. A fidelidade da síntese proteica depende da precisão dessa reação, e algumas dessas enzimas realizam etapas de edição em sítios ativos separados.

  **2.** Em bactérias, o aminoacil-tRNA iniciador de todas as proteínas é o *N*-formilmetionil-$tRNA^{fMet}$. A iniciação da síntese proteica envolve a formação de um complexo entre a subunidade 30S do ribossomo, o mRNA, GTP, fMet-$tRNA^{fMet}$, três fatores de iniciação e a subunidade 50S; o GTP é hidrolisado a GDP e $P_i$.

  **3.** Nos estágios de alongamento, GTP e fatores de alongamento são necessários para a ligação do novo aminoacil-tRNA que chega ao sítio A do ribossomo. Na primeira reação de transferência peptídica, o resíduo fMet é transferido para o grupo amino do novo aminoacil-tRNA. O movimento do ribossomo ao longo do mRNA transloca então o dipeptidil-tRNA do sítio A para o sítio P, um processo que requer hidrólise de GTP. O tRNA desacilado se dissocia do sítio E do ribossomo.

  **4.** Após muitos ciclos de alongamento, a síntese do polipeptídeo é finalizada com o auxílio dos fatores de liberação. Pelo menos quatro equivalentes fosfatados de alta energia (do ATP ou do GTP) são necessários para a formação de cada ligação peptídica, investimento energético necessário para garantir a fidelidade da tradução.

  **5.** Os polipeptídeos dobram-se nas suas formas ativas tridimensionais. Muitas proteínas são ainda processadas por reações de modificação pós-traducional.
- Muitos antibióticos e toxinas bem estudados inibem alguns aspectos da síntese proteica.

## 27.3 Endereçamento e degradação das proteínas

A célula eucariótica é composta por muitas estruturas, organelas e compartimentos, cada um com funções específicas que requerem conjuntos distintos de proteínas e enzimas. Essas proteínas (com exceção daquelas produzidas nas mitocôndrias e nos plastídeos) são sintetizadas nos ribossomos, no citosol; então, como elas são direcionadas para seus destinos finais na célula?

Hoje, esse complexo e fascinante processo começa a ser compreendido. As proteínas destinadas à secreção, à integração na membrana plasmática ou à inclusão nos lisossomos geralmente compartilham das primeiras etapas de uma via que inicia no retículo endoplasmático (RE). As proteínas destinadas às mitocôndrias, aos cloroplastos ou ao núcleo utilizam três mecanismos separados. E aquelas destinadas ao citosol simplesmente permanecem no local onde são sintetizadas.

O elemento mais importante em muitas dessas vias de endereçamento é uma sequência curta de aminoácidos, denominada **sequência sinal**, ou peptídeo sinalizador, cuja função foi postulada, pela primeira vez, por Günter Blobel e colaboradores, em 1970. A sequência sinal direciona a proteína para seu local apropriado na célula, e, em muitas proteínas, ela é removida durante o transporte ou depois que a proteína tenha alcançado seu destino final. Nas proteínas cujo destino é o transporte para mitocôndrias, cloroplastos ou RE, a sequência sinal está localizada na porção aminoterminal do polipeptídeo recém-sintetizado. Em muitos casos, a capacidade de endereçamento de certas sequências sinal foi confirmada por meio da fusão da sequência sinal de uma proteína com outra proteína, mostrando que o sinal direciona a segunda proteína para o local onde a primeira proteína é geralmente encontrada. A degradação seletiva das proteínas que não são mais necessárias para a célula também se baseia, em grande parte, em um conjunto de sinais moleculares incrustados na estrutura de cada proteína.

Günter Blobel

Nesta seção final, serão examinados o endereçamento e a degradação das proteínas, com ênfase nos sinais e na regulação molecular envolvidos, os quais são fundamentais para o metabolismo celular. Exceto quando citado, o foco agora será nas células eucarióticas.

## As modificações pós-traducionais de muitas proteínas eucarióticas têm início no retículo endoplasmático

Provavelmente, o sistema de endereçamento mais bem caracterizado tem início no RE. A maioria das proteínas lisossomais, das proteínas de membrana e das proteínas secretadas tem uma sequência sinal aminoterminal (**Figura 27-37**) que as marca para o transporte para dentro do lúmen do RE; centenas dessas sequências sinal já foram determinadas. O lado carboxil de uma sequência sinal é definido por um sítio de clivagem, no qual a protease age removendo a sequência depois que a proteína tenha sido importada para o RE. As sequências sinal variam em comprimento de 13 a 36 resíduos de aminoácidos, mas todas elas têm as seguintes características: (1) entre 10 e 15 resíduos de aminoácidos hidrofóbicos; (2) um ou mais resíduos carregados positivamente, geralmente próximos à extremidade amino e que precede a sequência hidrofóbica, e (3) uma sequência curta na extremidade carboxil (próxima do sítio de clivagem) que é relativamente polar, possuindo geralmente resíduos de aminoácidos com cadeias laterais curtas (principalmente Ala) nas posições mais próximas ao sítio de clivagem.

Como demonstrado originalmente por George Palade, proteínas contendo essas sequências sinal são sintetizadas nos ribossomos aderidos ao RE. A própria sequência sinal ajuda a direcionar o ribossomo ao RE, como ilustrado nas etapas ❶ a ❾ da **Figura 27-38**. ❶ A via de endereçamento começa com o início da síntese proteica nos ribossomos livres. ❷ A sequência sinal aparece logo no início do processo de síntese, pois está na extremidade amino, a qual, como foi visto, é sintetizada primeiro. ❸ À medida que vai emergindo do ribossomo, a sequência sinal – e o próprio ribossomo – liga-se à **partícula de reconhecimento de sinal** (**SRP**); a SRP então se liga ao GTP e suspende o alongamento do polipeptídeo quando esse tiver alcançado um tamanho aproximado de 70 aminoácidos e a sequência sinal tiver emergido completamente do ribossomo. ❹ A SRP ligada ao GTP direciona então o ribossomo (ainda ligado ao mRNA) e o polipeptídeo incompleto para receptores de SRP ligada a GTP, presentes no lado citosólico do RE; o polipeptídeo nascente é levado para o **complexo de translocação de peptídeos** no RE, o qual pode interagir diretamente com o ribossomo. ❺ Ocorre a dissociação da SRP do ribossomo, acompanhada da hidrólise de GTP, tanto na SRP como no receptor de SRP. ❻ O alongamento do polipeptídeo agora continua, com o complexo de translocação promovido por ATP levando o polipeptídeo nascente para dentro do lúmen do RE até que toda a proteína tenha sido sintetizada. ❼ A sequência sinal é removida por uma peptidase de sinal dentro do lúmen do RE; ❽ o ribossomo se dissocia e ❾ é reciclado.

George Palade, 1912-2008

sítio de clivagem

Vírus A da *influenza* humana: Met Lys Ala Lys Leu Leu Val Leu Leu Tyr Ala Phe Val Ala Gly ↓ Asp Gln --

Pré-pró-insulina humana: Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala ↓ Phe Val --

Hormônio de crescimento bovino: Met Met Ala Ala Gly Pro Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Ala Leu Leu Cys Leu Pro Trp Thr Gln Val Val Gly ↓ Ala Phe --

Promelitina da abelha: Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile Ser Tyr Ile Tyr Ala ↓ Ala Pro --

Proteína da cola de *Drosophila*: Met Lys Leu Leu Val Val Ala Val Ile Ala Cys Met Leu Ile Gly Phe Ala Asp Pro Ala Ser Gly ↓ Cys Lys --

**FIGURA 27-37 Sequências sinal aminoterminais de algumas proteínas eucarióticas que direcionam seu transporte para dentro do RE.** O núcleo hidrofóbico (em amarelo) é precedido por um ou mais resíduos básicos (em azul). Observe os resíduos polares e com cadeias laterais curtas logo antes (à esquerda) do sítio de clivagem (indicado por setas cor-de-rosa).

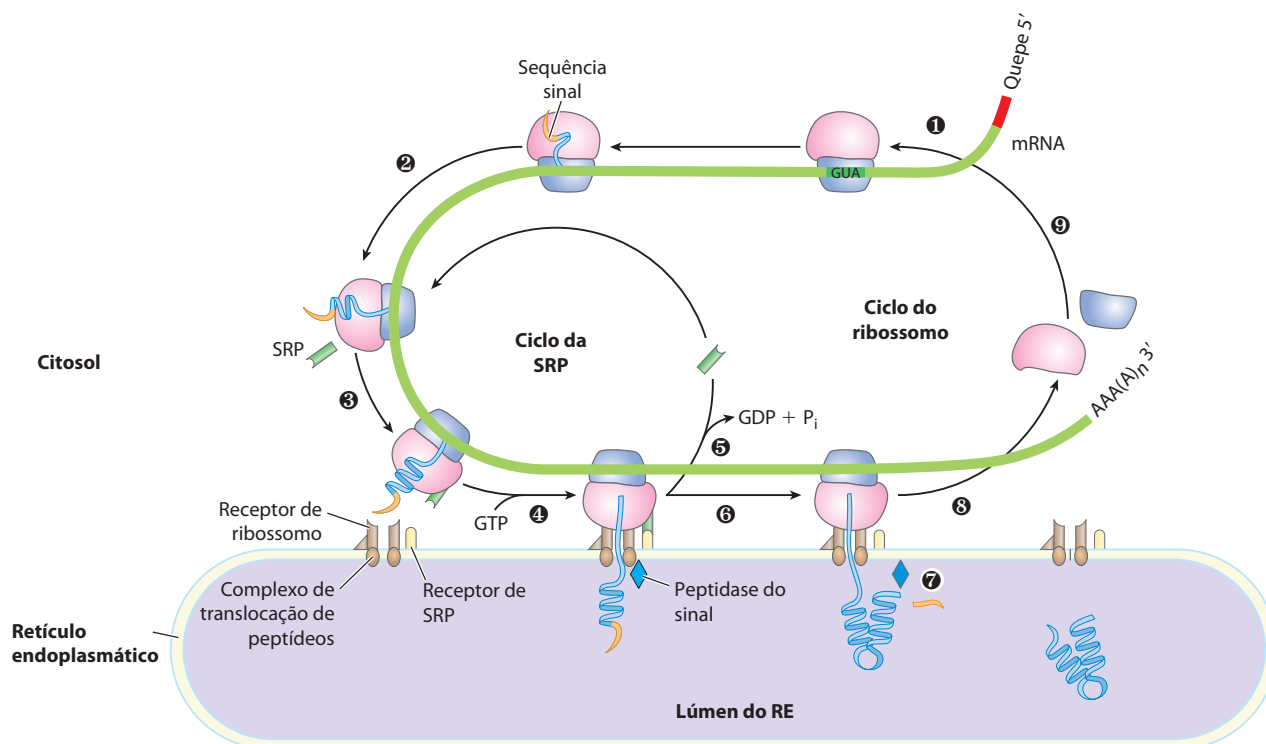



**FIGURA 27-38 Endereçamento das proteínas eucarióticas com os sinais apropriados para o retículo endoplasmático.** Esse processo envolve o ciclo da SRP, bem como o transporte e a clivagem do polipeptídeo nascente. As etapas estão descritas no texto. A SRP é um complexo em forma de bastão que contém um RNA de 300 nucleotídeos (7SL-RNA) e seis proteínas diferentes (massa combinada de $M_r$ 325.000). Uma das subunidades proteicas da SRP se liga diretamente à sequência sinal, inibindo o alongamento por meio do bloqueio espacial da entrada de aminoacil-tRNA e inibindo a peptidil-transferase. Outra subunidade da proteína se liga ao GTP, hidrolisando-o. O receptor da SRP é um heterodímero de subunidades $\alpha$ ($M_r$ 69.000) e $\beta$ ($M_r$ 30.000), ambas as quais se ligam a múltiplas moléculas de GTP, hidrolisando-as durante o processo.

## A glicosilação tem um papel-chave no endereçamento de proteínas

No lúmen do RE, as proteínas recém-sintetizadas são adicionalmente modificadas de várias maneiras. Após a remoção das sequências sinal, os polipeptídeos são dobrados, as pontes dissulfeto são formadas, e muitas proteínas são glicosiladas para formar glicoproteínas. Em muitas glicoproteínas, a ligação aos seus oligossacarídeos se dá por meio de resíduos de Asn. Existem diversos oligossacarídeos *N*-ligados (Capítulo 7), mas as vias pelas quais eles são formados apresentam uma primeira etapa em comum. Um oligossacarídeo central de 14 resíduos é formado passo a passo e depois transferido de uma molécula de dolicolfosfato doadora para determinados resíduos de Asn na proteína (**Figura 27-39**). A transferase fica na face luminal do RE e, portanto, não é capaz de catalisar a glicosilação de proteínas citosólicas. Após a transferência, o oligossacarídeo central sofre clivagens e ajustes, que variam nas diferentes proteínas, mas todos os oligossacarídeos *N*-ligados mantêm como cerne um pentassacarídeo derivado do oligossacarídeo original de 14 resíduos. Vários antibióticos agem interferindo em uma ou mais etapas desse processo e têm ajudado a elucidar os passos da glicosilação de proteínas. O mais bem caracterizado é a **tunicamicina**, que imita a estrutura da UDP-*N*-acetilglicosamina e bloqueia a primeira etapa do processo (Figura 27.39, etapa ❶). Algumas proteínas são *O*-glicosiladas no RE, mas a maioria das *O*-glicosilações ocorre no aparelho de Golgi ou no citosol (no caso das proteínas que não entram no RE).

**FIGURA 27-39 Síntese do oligossacarídeo central das glicoproteínas.** O oligossacarídeo central é construído pela adição sucessiva de unidades de monossacarídeos. ❶, ❷ As primeiras etapas ocorrem na face citosólica do RE. ❸ A translocação move o oligossacarídeo ainda incompleto através da membrana (mecanismo não mostrado), e ❹ a formação do oligossacarídeo completo ocorre dentro do lúmen do RE. Os precursores que fornecem resíduos adicionais de manose e de glicose ao oligossacarídeo em formação no lúmen são derivados do dolicol-fosfato. Na primeira etapa de montagem da porção de oligossacarídeo *N*-ligado de uma glicoproteína, ❺, ❻ o oligossacarídeo central é transferido do dolicol-fosfato para um resíduo de Asn da proteína dentro do lúmen do RE. O oligossacarídeo central é novamente modificado no RE e no aparelho de Golgi, por meio de vias que variam para diferentes proteínas. Os cinco resíduos de açúcar mostrados cercados por uma marcação em bege (após a etapa ❼) são mantidos na estrutura final de todos os oligossacarídeos *N*-ligados. ❽ O dolicol-pirofosfato liberado é novamente translocado, de forma que o pirofosfato fica no lado citosólico do RE, e então ❾ um fosfato é removido hidroliticamente para regenerar o dolicol-fosfato.

As proteínas adequadamente modificadas podem, então, ser transportadas para vários destinos na célula. As proteínas vão do RE para o aparelho de Golgi dentro de vesículas de transporte (**Figura 27-40**). No aparelho de Golgi, oligossacarídeos são *O*-ligados a algumas proteínas, e oligossacarídeos *N*-ligados são modificados. Via mecanismos ainda pouco conhecidos, o aparelho de Golgi também seleciona proteínas, enviando-as para seus destinos finais. Os processos por meio dos quais as proteínas que serão secretadas são segregadas daquelas direcionadas para a membrana plasmática ou para os lisossomos precisam distiguir essas proteínas com base em características estruturais que não sejam as sequências sinal, pois essas foram removidas no lúmen do RE.

Esse processo de seleção é mais bem compreendido no caso das hidrolases, cujo destino é serem transportadas aos lisossomos. Quando chega uma hidrolase (que é uma glicoproteína) no aparelho de Golgi, uma característica ainda não determinada (às vezes chamada de fragmento sinal) da estrutura tridimensional da hidrolase é reconhecida por uma fosfotransferase, a qual fosforila certos resíduos de manose do oligossacarídeo (**Figura 27-41**). A presença de um ou mais resíduos de manose 6-fosfato no seu oligossacarídeo *N*-ligado é o sinal estrutural que direciona uma proteína para os lisossomos. Uma proteína receptora na membrana do aparelho de Golgi reconhece o sinal de manose 6-fosfato e liga a hidrolase assim marcada. Vesículas contendo esses complexos de receptor-hidrolase brotam da porção *trans* do aparelho de Golgi e vão até vesículas de seleção. Nessas vesículas de seleção, o complexo receptor-hidrolase se dissocia por meio de um processo que é facilitado pelo pH mais baixo da vesícula e pela remoção, catalisada por uma fosfatase, dos grupos fosfato dos resíduos de manose 6-fosfato. O receptor é então reciclado para o aparelho de Golgi, e as vesículas contendo as hidrolases brotam das vesículas de seleção e se dirigem aos lisossomos. Em células tratadas com tunicamicina (Figura 27-39, etapa ❶), as hidrolases que deveriam ser direcionadas aos lisossomos são secretadas, confirmando que o oligossacarídeo *N*-ligado exerce papel-chave no endereçamento dessas enzimas para os lisossomos.

As vias que direcionam as proteínas para mitocôndrias e cloroplastos também se baseiam em sequências sinal aminoterminais. Apesar de mitocôndrias e cloroplastos conterem DNA, a maioria das suas proteínas é codificada pelo DNA nuclear e deve ser direcionada às devidas organelas. No entanto, diferentemente de outras vias de endereçamento, no caso das vias para mitocôndrias e cloroplastos, essas iniciam somente *depois* que a proteína precursora tenha sido completamente sintetizada e liberada dos ribos-

**FIGURA 27-40 Via adotada pelas proteínas com destino aos lisossomos, à membrana plasmática ou à secreção.** As proteínas são transportadas do RE para a porção *cis* do aparelho de Golgi dentro de vesículas de transporte. A seleção ocorre principalmente no lado *trans* do aparelho de Golgi.

somos. As proteínas precursoras destinadas a mitocôndrias ou cloroplastos são ligadas por proteínas citosólicas da família das chaperonas e levadas até receptores presentes na superfície externa da organela de destino. Mecanismos de translocação especializados transportam então a proteína até seu destino final na organela e, após essa etapa, a sequência sinalizadora é removida.

## As sequências sinal para o transporte nuclear não são clivadas

A comunicação molecular entre o núcleo e o citosol requer o movimento de macromoléculas através de poros na membrana nuclear. As moléculas de RNA sintetizadas no núcleo são exportadas para o citosol. Proteínas ribossomais sintetizadas em ribossomos citosólicos são importadas para o núcleo e montadas para formar as subunidades 60S e 40S dos ribossomos no nucléolo; as subunidades completas são exportadas de volta para o citosol. Diversas proteínas nucleares (RNA e DNA-polimerases, histonas, topoisome-

UDP *N*-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc)

Uridina

Resíduo de manose

Oligossacarídeo — Enzima

Hidrolase

*N*-acetilglicosamina-fosfotransferase

UMP

Fosfodiesterase

GlcNAc

Resíduo de manose 6-fosfato

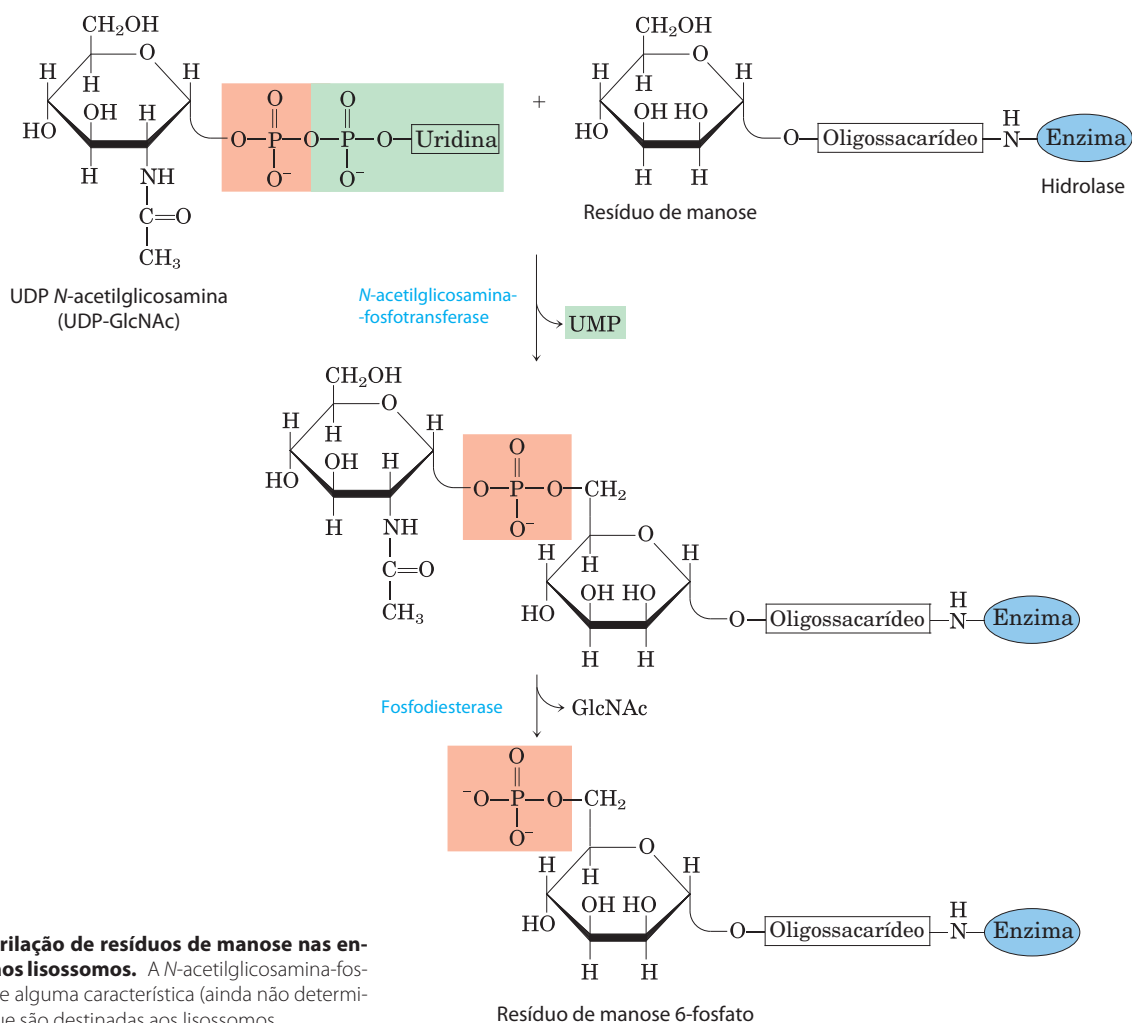



**FIGURA 27-41 Fosforilação de resíduos de manose nas enzimas direcionadas aos lisossomos.** A *N*-acetilglicosamina-fosfotransferase reconhece alguma característica (ainda não determinada) das hidrolases que são destinadas aos lisossomos.

rases, proteínas que regulam a expressão gênica e assim por diante) são sintetizadas no citosol e importadas para o núcleo. Esse tráfego é modulado por um complexo sistema que envolve sinais moleculares e proteínas de transporte, o qual vem sendo aos poucos elucidado.

Na maioria dos eucariotos multicelulares, o envelope nuclear é rompido a cada divisão celular; quando a divisão termina e o envelope é restabelecido, as proteínas nucleares que haviam se dispersado precisam ser novamente importadas para o núcleo. A fim de permitir essa importação repetidas vezes, a sequência sinal que direciona uma proteína para o núcleo – a **sequência de localização nuclear** (**NLS**) – não é removida depois que a proteína atinge seu destino. Uma NLS, ao contrário de outras sequências sinal, pode estar localizada praticamente em qualquer região da sequência primária da proteína. As NLS podem variar consideravelmente, mas muitas consistem em quatro a oito resíduos de aminoácidos e incluem vários resíduos básicos (Arg ou Lys) consecutivos.

A importação nuclear é mediada por várias proteínas que circulam entre o citosol e o núcleo (**Figura 27-42**), incluindo importina $\alpha$ e $\beta$ e uma pequena GTPase conhecida como Ran (proteína nuclear relacionada à *Ras*). Um heterodímero de importina $\alpha$ e $\beta$ funciona como um receptor solúvel para proteínas direcionadas ao núcleo, com a subunidade $\alpha$ ligando-se a proteínas que têm NLS no citosol. O complexo da importina com a proteína que tem NLS aporta em um poro nuclear e é transportado através do poro por um mecanismo dependente de energia. No núcleo, a importina $\beta$ é ligada à Ran GTPase, liberando a importina $\beta$ da proteína importada. A importina $\alpha$ é ligada à Ran e à CAS (proteína celular de suscetibilidade à apoptose) e é separada da proteína que tem NLS. As importinas $\alpha$ e $\beta$, complexadas com Ran e CAS, são então exportadas do núcleo. A Ran hidrolisa GTP no citosol para liberar as importinas, as quais ficam então livres para iniciar um novo ciclo de importação. A própria Ran é reciclada de volta para o núcleo pela ligação da Ran-GDP ao

(a)

(b)

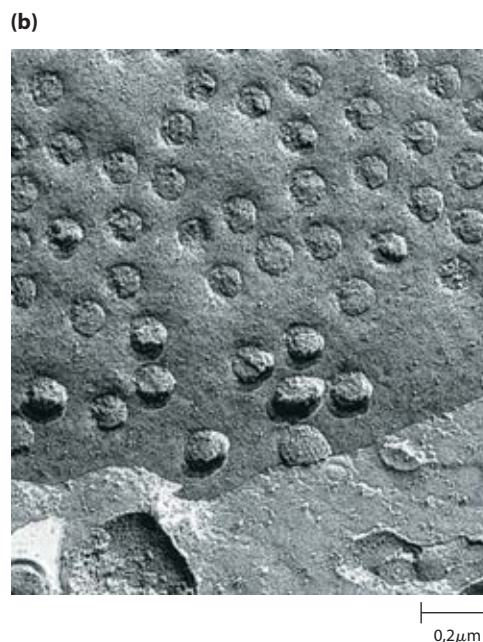
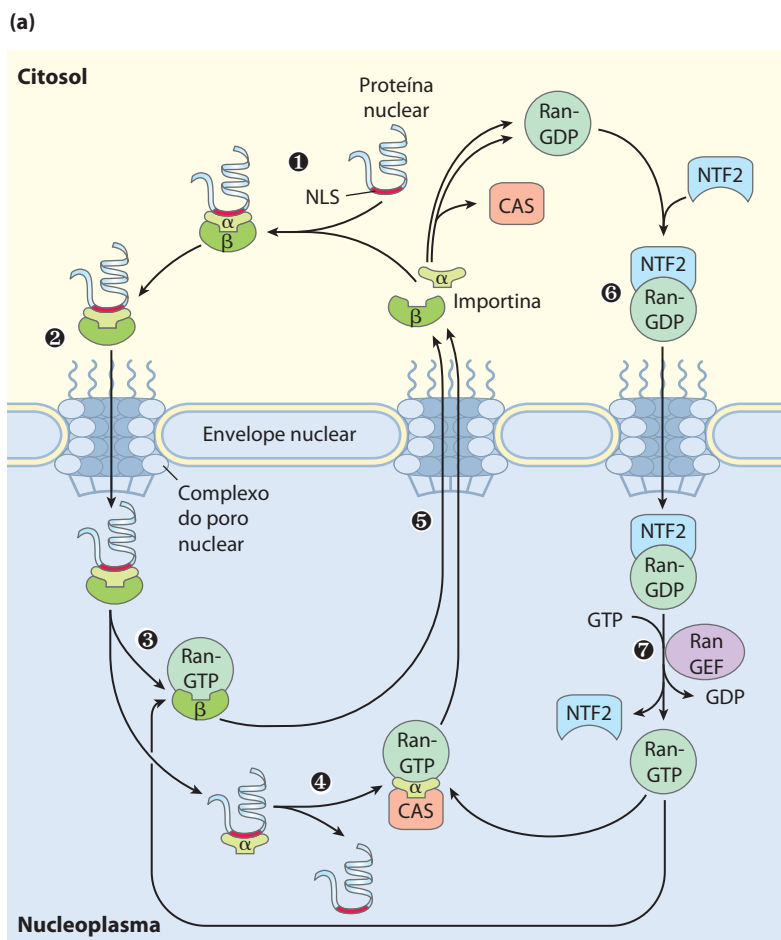



**FIGURA 27-42 Endereçamento de proteínas nucleares. (a)** ❶ Uma proteína com um sinal de localização nuclear (NLS) apropriado é ligada a um complexo de importina $\alpha$ e $\beta$. ❷ O complexo resultante se liga a um poro nuclear e é translocado. ❸ Dentro do núcleo, a dissociação da importina $\beta$ é favorecida pela ligação da Ran-GTP. ❹ A importina $\alpha$ se liga à Ran-GTP e à CAS (proteína celular de sucetibilidade à apoptose), liberando a proteína nuclear. ❺ As importinas $\alpha$ e $\beta$ e a CAS são transportadas para fora do núcleo e então recicladas. Elas são liberadas no citosol quando a Ran hidrolisa o seu GTP ligado. ❻ A Ran-GDP se liga ao NFT2 e é transportada de volta para o núcleo. ❼ A RanGEF favorece a troca de GDP por GTP no núcleo, e a Ran-GTP fica pronta para processar outro complexo de proteína e importina contendo NLS. **(b)** Micrografia eletrônica de varredura da superfície do envelope nuclear, mostrando vários poros nucleares. O complexo do poro nuclear é um dos maiores agregados proteicos presentes na célula ($M_r \sim 5 \times 10^7$). Ele é formado por múltiplas cópias de mais de 30 proteínas diferentes.

**FIGURA 27-43 Sequências sinal que direcionam as proteínas a diferentes locais nas bactérias.** Aminoácidos básicos (em azul) próximos à extremidade amino e aminoácidos hidrofóbicos do cerne (em amarelo) estão destacados. Os sítios de clivagem que marcam o final das sequências sinal estão indicados por setas cor-de-rosa. Observe que a membrana celular interna das bactérias (ver Figura 1-6) é onde o DNA e as proteínas de envelope de fagos fd são montadas para formar as partículas virais. A OmpA é a proteína A da membrana externa; a LamB é uma proteína da superfície celular receptora do fago λ.

fator 2 de transporte nuclear (NTF2). Dentro do núcleo, o GDP ligado à Ran é substituído por GTP pela ação do fator de troca Ran-nucleotídeo da guanosina (RanGEF; ver Quadro 12-2).

## As bactérias também usam sequências sinal para o endereçamento das proteínas

As bactérias são capazes de direcionar proteínas para a membrana interna ou externa, para o espaço periplásmico entre essas membranas, ou para o meio extracelular. Elas usam sequências sinal presentes na extremidade amino das proteínas (**Figura 27-43**), de modo semelhante àquelas das proteínas eucarióticas que são direcionadas ao RE, às mitocôndrias e aos cloroplastos.

A maioria das proteínas exportadas de *E. coli* fazem uso da via mostrada na **Figura 27-44**. Após a tradução, uma proteína a ser exportada se dobra de forma mais lenta, pois a sequência sinal aminoterminal impede o seu enovelamento. A proteína chaperona solúvel SecB se liga à sequência sinal da proteína ou a outras partes da sua estrutura na proteína ainda parcialmente dobrada. A proteína ligada é então levada à SecA, proteína associada à superfície interna da membrana plasmática. A SecA atua tanto como receptor quanto como ATPase de transporte. Quando liberada da SecB e ligada à SecA, a proteína é levada para um complexo de transporte na membrana, constituído de SecY, E e G, e é transportada, em etapas, através da membrana no complexo SecYEG, sendo que em cada etapa passam cerca de 20 resíduos de aminoácidos.

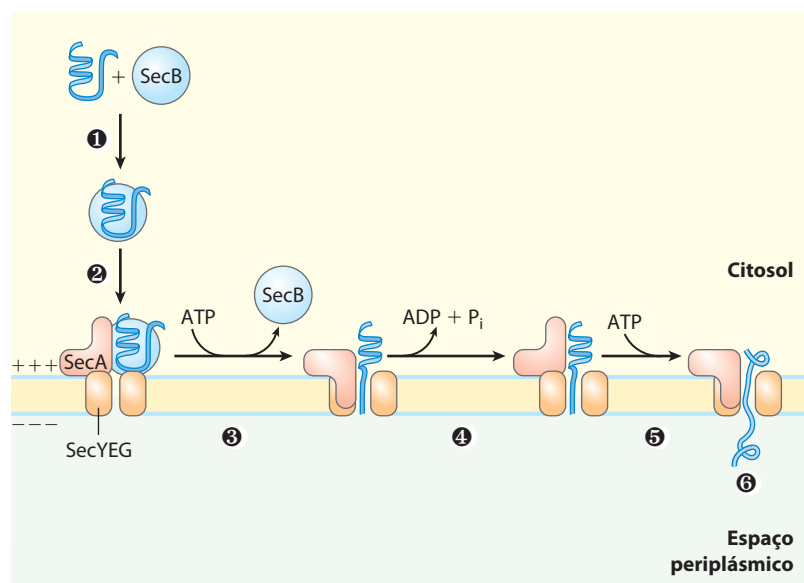



**FIGURA 27-44 Modelo para a exportação de proteínas em bactérias.** ❶ Um polipeptídeo recém-traduzido se liga à proteína chaperona citosólica SecB, a qual ❷ o leva até a SecA, uma proteína associada ao complexo de transporte (SecYEG) na membrana celular bacteriana. ❸ A SecB é liberada, e a SecA se insere na membrana, forçando a passagem de cerca de 20 resíduos de aminoácidos da proteína a ser exportada por meio do complexo de transporte. ❹ A hidrólise de um ATP pela SecA fornece a energia para que ocorra uma mudança conformacional, a qual faz a SecA se soltar da membrana, liberando o polipeptídeo. ❺ A SecA liga outro ATP, e o próximo segmento de 20 resíduos de aminoácidos é empurrado por meio do complexo de transporte presente na membrana. As etapas ❹ e ❺ são repetidas até que ❻ toda a proteína tenha passado através da membrana, sendo liberada no periplasma. O potencial eletroquímico dentro da membrana (definido como + e –) também fornece parte da energia necessária para o transporte das proteínas.

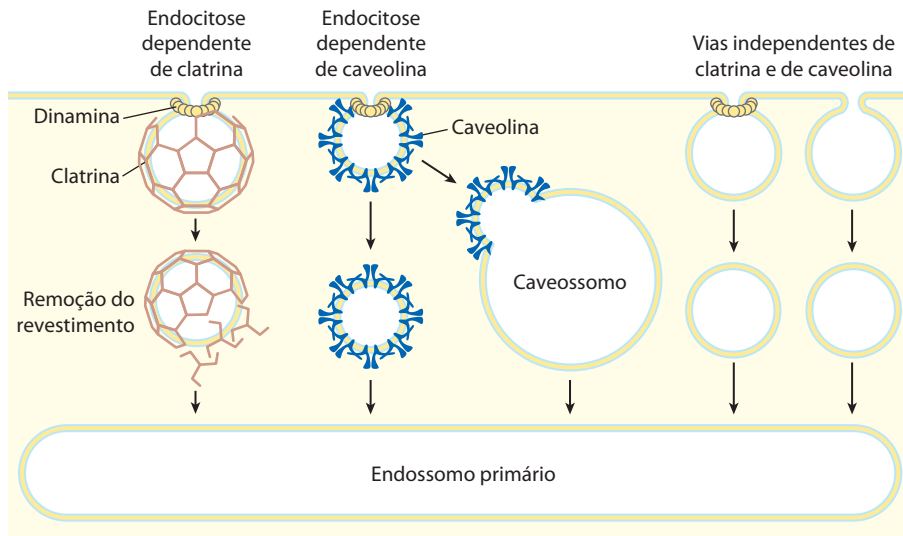



**FIGURA 27-45 Resumo das vias endocíticas em células eucarióticas.** As vias dependentes de clatrina e de caveolina fazem uso da GTPase dinamina para desprender as vesículas da membrana plasmática. Algumas vias não utilizam clatrina nem caveolina; algumas delas fazem uso da dinamina, enquanto outras não.

Cada etapa é facilitada pela hidrólise de ATP, catalisada pela SecA.

Uma proteína exportada é, assim, empurrada através da membrana por uma proteína SecA localizada na superfície citoplasmática, e não puxada pela membrana por uma proteína localizada na superfície periplásmica. Tal diferença pode simplesmente refletir a necessidade de a ATPase estar onde está o ATP. O potencial eletroquímico através da membrana também fornece energia para o transporte da proteína, por meio de um mecanismo ainda desconhecido.

Apesar de a maioria das proteínas bacterianas exportadas utilizar essa via, algumas seguem uma via alternativa que utiliza o reconhecimento de sinais e proteínas receptoras homólogas aos componentes da SRP e do receptor de SRP eucarióticos (Figura 27-38).

## As células importam proteínas por meio de endocitose mediada por receptor

Algumas proteínas são importadas do meio externo para dentro das células eucarióticas; exemplos são a lipoproteína de baixa densidade (LDL), a proteína carreadora de ferro transferrina, hormônios peptídicos e proteínas circulantes destinadas à degradação. Existem várias vias de importação (**Figura 27-45**). Em uma das vias, as proteínas se ligam a receptores em invaginações da membrana denominadas **depressões revestidas**, nas quais existe uma concentração preferencial de receptores endocíticos em relação a outras proteínas de superfície celular. As depressões são revestidas, no lado citosólico, por uma rede formada pela proteína **clatrina**, a qual forma estruturas poliédricas fechadas (**Figura 27-46**). A rede de clatrina aumenta à medida que mais receptores vão sendo ocupados pelas proteínas-alvo. Por fim, uma vesícula endocítica completa ainda ligada à membrana se solta da membrana plasmática com ajuda da **dinamina**, uma GTPase grande, e entra no citoplasma. A clatrina é rapidamente removida por enzimas removedoras de revestimento, e a vesícula se funde a um endossomo. A atividade ATPásica nas membranas reduz o pH interno do endossomo, facilitando a dissociação dos receptores de suas proteínas-alvo. Em uma via relacionada, a caveolina causa a invaginação de segmentos da membrana contendo balsas lipídicas associadas a certos tipos de receptores (ver Figura 11-22). Essas vesículas endocíticas se fundem então com estruturas internas contendo caveolina, chamadas de caveossomos, nos quais as moléculas internalizadas são selecionadas e redirecionadas para outras partes da célula, e as caveolinas são preparadas para serem recicladas para a superfície da membrana. Também existem vias independentes de clatrina e de caveolina; algumas fazem uso da dinamina, e outras não.

**FIGURA 27-46 Clatrina. (a)** Três cadeias leves (L) ($M_r$ 35.000) e três cadeias pesadas (H) ($M_r$ 180.000) da unidade de clatrina $(HL)_3$, organizadas em uma estrutura de três pernas chamada de trísceles. **(b)** Os trísceles tendem a se agrupar formando redes poliédricas. **(c)** Micrografia eletrônica de uma depressão revestida presente na face citosólica da membrana plasmática de um fibroblasto.

As proteínas e os receptores importados seguem então seus caminhos separados, e seus destinos variam conforme o tipo de célula e de proteína. A transferrina e seu receptor são, no fim, reciclados. Alguns hormônios, fatores de crescimento e complexos do sistema imune, após induzirem a resposta celular apropriada, são degradados juntamente com seus receptores. A LDL é degradada depois que o colesterol associado a ela tenha sido levado até seu destino, mas o receptor de LDL é reciclado (ver Figura 21-41).

A endocitose mediada por receptor é utilizada por algumas toxinas e por alguns vírus para a entrada nas células. O vírus da *influenza*, a toxina diftérica e a toxina da cólera entram na célula desta maneira.

## A degradação de proteínas é mediada por sistemas especializados em todas as células

A degradação de proteínas evita o acúmulo de proteínas anormais ou não desejáveis e permite a reciclagem dos aminoácidos. A meia-vida das proteínas eucarióticas varia de 30 segundos até muitos dias. Muitas proteínas apresentam uma taxa de renovação rápida, se for considerado o tempo de vida de uma célula, embora umas poucas (como a hemoglobina) possam durar por toda a vida da célula (cerca de 110 dias no caso de um eritrócito). As proteínas rapidamente degradadas incluem aquelas que são defeituosas em virtude da inserção de aminoácidos errados ou em virtude de danos acumulados durante o funcionamento normal. As enzimas que atuam em pontos-chave da regulação de vias metabólicas geralmente apresentam uma rápida renovação.

As proteínas defeituosas e aquelas com meia-vida caracteristicamente curta em geral são degradadas tanto nas células bacterianas como nas eucarióticas por sistemas citosólicos seletivos dependentes de ATP. Um segundo sistema, que opera nos lisossomos das células de vertebrados, recicla os aminoácidos das proteínas de membrana, das proteínas extracelulares e das proteínas de meia-vida caracteristicamente longa.

Em *E. coli*, muitas proteínas são degradadas por uma protease dependente de ATP denominada Lon (o nome se refere à "forma longa" das proteínas, que somente é observada quando essa protease está ausente). Essa protease é ativada na presença de proteínas defeituosas ou de proteínas destinadas a uma rápida rotatividade; duas moléculas de ATP são hidrolisadas para cada ligação peptídica clivada. Ainda não está claro qual é o exato papel dessa hidrólise de ATP. Uma vez que a proteína tenha sido reduzida a pequenos peptídeos inativos, outras proteases independentes de ATP completam o processo de degradação.

A via dependente de ATP em células eucarióticas é um tanto diferente, envolvendo a proteína **ubiquitina**, a qual, como o nome sugere, está presente em todos os reinos eucarióticos. Sendo uma das proteínas mais altamente conservadas que se conhece, a ubiquitina (composta por 76 resíduos de aminoácidos) é essencialmente idêntica em organismos muito diferentes, como, por exemplo, em leveduras e humanos. A ubiquitina é ligada covalentemente a proteínas destinadas à destruição por meio de uma via dependente de ATP, que envolve três tipos diferentes de enzimas, denominadas enzimas ativadoras E1, enzimas conjugadoras E2 e ligases E3 (**Figura 27-47**).

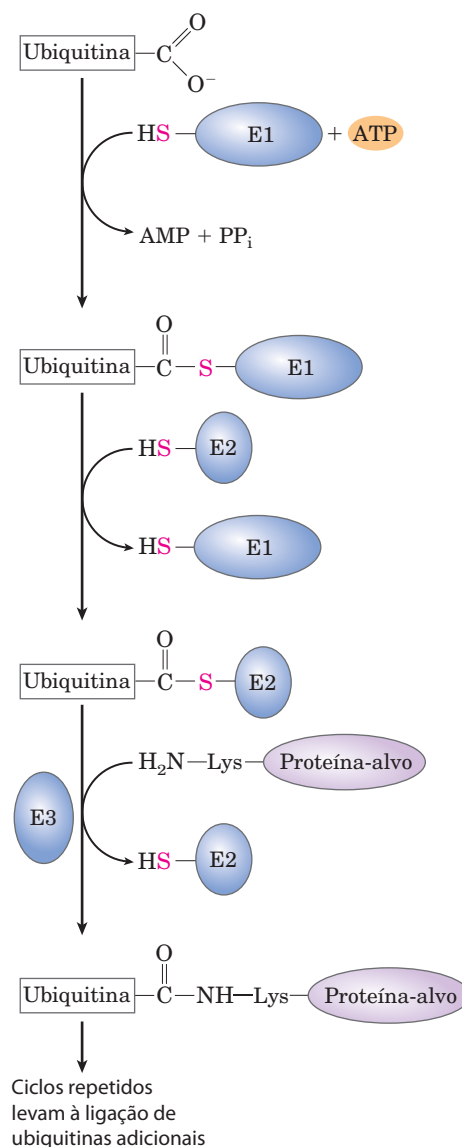



**FIGURA 27-47 Via em três etapas por meio da qual a ubiquitina é ligada a uma proteína.** Dois intermediários diferentes de enzima-ubiquitina estão envolvidos. O grupo carboxila livre do resíduo de Gly da extremidade carboxil da ubiquitina liga-se primeiro a uma enzima ativadora da classe E1 por meio de um tioéster. A ubiquitina é então transferida para uma enzima conjugadora E2. Uma ligase E3 finalmente catalisa a transferência da ubiquitina da E2 para o alvo, ligando a ubiquitina, por meio de uma ligação amida (isopeptídica), a um grupo $\varepsilon$-amino de um resíduo de Lys da proteína-alvo. Ciclos adicionais produzem poliubiquitina, polímero covalente composto por subunidades de ubiquitina que direcionam a proteína ligada para que essa seja destruída nos eucariotos. Múltiplas vias desse tipo, com diferentes alvos das proteínas, estão presentes na maioria das células eucarióticas.

As proteínas ubiquitinadas são degradadas por um grande complexo conhecido como **proteassomo 26S** ($M_r$ $2{,}5 \times 10^6$) (**Figura 27-48**). O proteassomo eucariótico consiste em duas cópias, cada uma de, no mínimo, 32 subunidades diferentes, a maioria das quais é altamente conservada, de leveduras até humanos. O proteassomo contém dois tipos principais de subcomplexos, uma partícula central em forma de barril e partículas reguladoras em cada lado do bar-

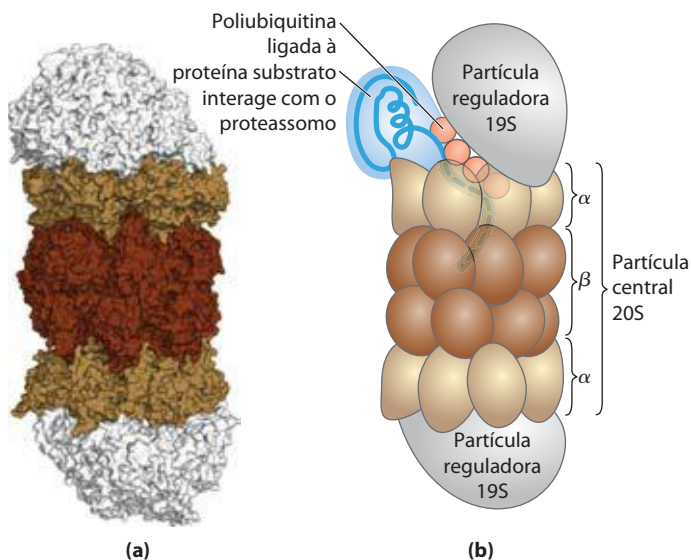



**FIGURA 27-48 Estrutura tridimensional do proteassomo eucariótico.** O proteassomo 26S é altamente conservado em todos os eucariotos. As duas subconstruções são a partícula central de 20S e a partícula reguladora de 19S, ou quepe. **(a)** (PDB ID 3L5Q) A partícula central consiste em quatro anéis, organizados de maneira a formar uma estrutura semelhante a um barril. Cada um dos anéis internos tem sete subunidades $\beta$ diferentes (marrom-escuro), três das quais têm atividade proteásica. Cada anel externo tem sete subunidades $\alpha$ diferentes (marrom-claro). **(b)** Uma partícula reguladora forma um quepe em cada uma das extremidades da partícula central (cinza). (a). A partícula reguladora liga-se a poteínas ubiquitinadas, desdobra-as e as transloca para dentro da partícula central, onde elas são degradadas a peptídeos de 3 a 25 aminoácidos

ril. A partícula central de 20S consiste em quatro anéis; os anéis externos são formados por sete subunidades $\alpha$, e os internos por sete subunidades $\beta$. Três das sete subunidades em cada anel $\beta$ apresentam atividade proteásica, cada uma com diferentes especificidades de substrato. Os anéis empilhados da partícula central formam a estrutura semelhante a um barril dentro da qual as proteínas-alvo são degradadas. A partícula reguladora 19S de cada extremidade da partícula central contém aproximadamente 18 subunidades, incluindo algumas que reconhecem e se ligam a proteínas ubiquitinadas. Seis das subunidades são AAA+ ATPases (ver Capítulo 25), que provavelmente funcionam desdobrando as proteínas ubiquitinadas e transportando o polipeptídeo desdobrado para dentro da partícula central, para que ocorra a degradação do mesmo. A partícula 19S também desubiquitina as proteínas à medida que essas vão sendo degradadas no proteassomo. A maioria das células tem complexos de regulação adicionais que podem substituir a partícula 19S. Esses reguladores alternativos não hidrolisam ATP e não ligam ubiquitina, mas são importantes para a degradação de proteínas celulares específicas. O proteassomo 26S pode ser efetivamente "assessorado", com complexos de regulação que mudam conforme mudam as condições na célula.

Nem todos os sinais que desencadeiam a ubiquitinação são bem compreendidos ainda. Apesar disso, um sinal simples foi encontrado. Para muitas proteínas, a identidade do primeiro resíduo que permanece após a remoção do resíduo Met aminoterminal, e qualquer outro processamento proteolítico pós-traducional da extremidade aminoterminal, apresenta grande influência na meia-vida (Tabela 27-9). Esses sinais aminoterminais foram conservados ao longo de bilhões de anos de evolução e são os mesmos nos sistemas de degradação de proteínas em bactérias e na via de ubiquitinação em humanos. Sinais mais complexos, como a sequência de destruição discutida no Capítulo 12 (ver Figura 12-47), também vêm sendo identificados.

A proteólise dependente de ubiquitina é importante tanto para a regulação de processos celulares como para a eliminação de proteínas defeituosas. Muitas proteínas solicitadas em apenas um estágio do ciclo de uma célula eucariótica são rapidamente degradadas pela via dependente de ubiquitina após completarem sua função. A destruição da ciclina dependente de ubiquitina é crucial para a regulação do ciclo celular (ver Figura 12-47). Os componentes E1, E2 e E3 da via de ubiquitinação (Figura 27-47) são, na verdade, grandes famílias de proteínas. Enzimas E1, E2 e E3 diferentes apresentam especificidades diferentes para proteínas-alvo e, portanto, regulam processos celulares diferentes. Algumas dessas enzimas ficam muito concentradas em determinados compartimentos celulares, refletindo uma função especializada.

Não é de surpreender que defeitos na via de ubiquitinação tenham implicação em uma variedade de estados patológicos. A incapacidade de degradar algumas proteínas que ativam a divisão celular (produtos de oncogenes) pode levar à formação de tumores, enquanto o mesmo efeito pode ser causado por uma degradação muito rápida de proteínas que atuam como supressores tumorais. A degradação não eficiente ou muito rápida de proteínas celulares também parece desempenhar um papel em uma variedade de outras condições: doenças renais, asma, doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (associadas à formação de estruturas proteináceas características nos neurônios), fibrose cística (causada, em alguns casos, por uma degradação muito rápida de um canal de cloreto, resultando em sua perda de função; ver Quadro 11-2), síndrome de Liddle (na qual

**TABELA 27-9** Relações entre a meia-vida de uma proteína e o resíduo de aminoácido da sua extremidade amino

| Resíduo aminoterminal | Meia-vida* |
|---|---|
| **Estabilizadores** | |
| Ala, Gly, Met, Ser, Thr, Val | >20 h |
| **Desestabilizadores** | |
| Gln, Ile | ~30 min |
| Glu, Tyr | ~10 min |
| Pro | ~7 min |
| Asp, Leu, Lys, Phe | ~3 min |
| Arg | ~2 min |

**Fonte:** Modificado de Bachmair, A., Finley, D., Varshavsky, A. (1986) In vivo half-life of a protein is a function of its aminoterminal residue. *Science* **234**, 179-186.
*As meias-vidas foram medidas em leveduras para a proteína $\beta$-galactosidase, que foi modificada de forma a possuir um resíduo aminoterminal diferente em cada experimento. As meias-vidas variam para diferentes proteínas e em diferentes organismos, mas esse padrão geral parece manter-se em todos os organismos.

um canal de sódio no rim não é degradado, levando à absorção de $Na^+$ em excesso e a um início precoce de hipertensão) – e muitas outras doenças. Fármacos desenvolvidos para inibir a função proteassômica estão sendo utilizados como tratamentos potenciais para algumas dessas condições. Em um ambiente metabólico que sofre constantes mudanças, a degradação de proteínas é tão importante para a sobrevivência de uma célula quanto à síntese proteica, e muito ainda está por ser descoberto a respeito dessas interessantes vias. ■

## RESUMO 27.3 Endereçamento e degradação das proteínas

- Após serem sintetizadas, muitas proteínas são direcionadas para locais específicos na célula. Um dos mecanismos de endereçamento envolve uma sequência peptídica sinalizadora, geralmente encontrada na extremidade amino de uma proteína recém-sintetizada.
- Nas células eucarióticas, uma classe de sequências sinal é reconhecida pela partícula de reconhecimento de sinal (SRP), a qual se liga à sequência sinal logo que essa aparece no ribossomo e transfere todo o ribossomo e o polipeptídeo incompleto para o RE. Os polipeptídeos contendo essas sequências sinal são transportados para dentro do lúmen do RE à medida que vão sendo sintetizados; no lúmen, eles podem ser modificados e transportados para o aparelho de Golgi, para depois serem selecionados e enviados para os lisossomos, para a membrana plasmática ou para vesículas de transporte.
- As proteínas direcionadas para mitocôndrias e cloroplastos nas células eucarióticas e aquelas destinadas para exportação nas bactérias também fazem uso de uma sequência sinal aminoterminal.
- As proteínas direcionadas para o núcleo têm uma sequência sinal interna que, diferentemente de outras sequências sinal, não é clivada após o endereçamento adequado da proteína.
- Algumas células eucarióticas importam proteínas por meio de endocitose mediada por receptor.
- Todas as células no final degradam proteínas utilizando sistemas proteolíticos especializados. As proteínas defeituosas e aquelas destinadas a uma rápida renovação são geralmente degradadas por um sistema dependente de ATP. Nas células eucarióticas, as proteínas são, primeiramente, marcadas pela ligação à ubiquitina, uma proteína altamente conservada. A proteólise dependente de ubiquitina é realizada pelos proteassomos – também altamente conservados – e é crucial para a regulação de muitos processos celulares.

## Termos-chave

*Termos em negrito estão definidos no glossário.*



## Leituras adicionais

### Código genético

**Ambrogelly, A., Palioura, S., & Söll, D.** (2007) Natural expansion of the genetic code. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 29–35.

**Blanc, V. & Davidson, N.O.** (2003) C-to-U RNA editing: mechanisms leading to genetic diversity. *J. Biol. Chem.* **278**, 1395–1398.

**Crick, F.H.C.** (1966) The genetic code: III. *Sci. Am.* **215** (October), 55–62.

Uma visão geral criteriosa do código genético em uma época em que as palavras do código haviam sido há pouco desvendadas.

**Farajollahi, S. & Maas, S.** (2010) Molecular diversity through RNA editing: a balancing act. *Trends Genet.* **26**, 221–230.

**Hohn, M.J., Park, H.S., O'Donoghue, P., Schnitzbauer, M., & Söll, D.** (2006) Emergence of the universal genetic code imprinted in an RNA record. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 18,095–18,100.

**Levanon, K., Eisenberg E., Rechavi G., & Levanon, E.Y.** (2005) Letter from the editor: adenosine-to-inosine RNA editing in Alu repeats in the human genome. *EMBO Rep.* **6**, 831–835.

**Liu, M. & Schatz, D.G.** (2009) Balancing AID and DNA repair during somatic hypermutation. *Trends Immunol.* **30**, 173–181.

**Lobanov, A.V., Turanov, A.A., Hatfield, D.L., & Gladyshev, V.N.** (2010) Dual functions of codons in the genetic code. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **45**, 257–265.

**Neeman, Y., Dahary, D., & Nishikura, K.** (2006) Editor meets silencer: crosstalk between RNA editing and RNA interference. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 919–931.

**Nirenberg, M.** (2004) Historical review: deciphering the genetic code—a personal account. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 46–54.

**Schimmel, P. & Beebe, K.** (2004) Molecular biology—genetic code seizes pyrrolysine. *Nature* **431**, 257–258.

**Vetsigian, K., Woese, C., & Goldenfeld, N.** (2006) Collective evolution and the genetic code. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 10,696–10,701.

**Yanofsky, C.** (2007) Establishing the triplet nature of the genetic code. *Cell* **128**, 815–818.

**Yarus, M., Caporaso, J.G., & Knight, R.** (2005) Origins of the genetic code: the escaped triplet theory. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 179–198.

### Síntese de proteínas

**Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., & Steitz, T.A.** (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**, 905–920.
A primeira estrutura em alta resolução de uma subunidade ribossomal importante.

**Ben-Shem, A., de Loubresse, N.G., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M.** (2011) The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* **334**, 1524–1529.

**Chapeville, F., Lipmann, F., von Ehrenstein, G., Weisblum, B., Ray, W.J., Jr., & Benzer, S.** (1962) On the role of soluble ribonucleic acid in coding for amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1086–1092.
Experimentos clássicos fornecem provas para a hipótese do adaptador proposta por Crick e mostram que os aminoácidos não são conferidos após se ligarem aos tRNAs.

**Decatur, W.A. & Fournier, M.J.** (2002) rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 344–351.

**Dintzis, H.M.** (1961) Assembly of the peptide chains of hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 247–261.
Experimento clássico estabelece que as proteínas são montadas a partir da extremidade amino.

**Dunkle, J.A. & Cate, J.H.D.** (2010) Ribosome structure and dynamics during translocation and termination. *Annu. Rev. Biophys.* **39**, 227–244.

**Gray, N.K. & Wickens, M.** (1998) Control of translation initiation in animals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 399–458.

**Ibba, M. & Söll, D.** (2000) Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem*. **69**, 617–650.

**Korostelev, A. & Noller, H.F.** (2007) The ribosome in focus: new structures bring new insights. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 434–441.

**Korostelev, A., Trakhanov, S., Laurberg, M., & Noller, H.F.** (2006) Crystal structure of a 70S ribosome-tRNA complex reveals functional interactions and rearrangements. *Cell* **126**, 1065–1077.

**Liu, C.C. & Schultz, P. G.** (2010) Adding new chemistries to the genetic code. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 413–444.

**Poehlsgaard, J. & Douthwaite, S.** (2005) The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 870–881.

**Rodnina, M.V. & Wintermeyer, W.** (2001) Fidelity of aminoacyl-tRNA selection on the ribosome: kinetic and structural mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 415–435.

**Woese, C.R., Olsen, G.J., Ibba, M., & Söll, D.** (2000) Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 202–236.

### Endereçamento e degradação das proteínas

**Bedford, L., Lowe, J., Dick, L.R., Mayer, R.J., & Brownell, J.E.** (2011) Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin-proteasome system as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 29–46.

**DeMartino, G.N. & Gillette, T.G.** (2007) Proteasomes: machines for all reasons. *Cell* **129**, 659-662.

**Ferguson, S.M. & De Camilli, P.** (2012) Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 75–88.

**Hartmann-Petersen, R., Seeger, M., & Gordon C.** (2003) Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 26–31.

**Komander, D. & Rape, M.** (2012) The ubiquitin code. *Annu. Rev. Biochem.* **81,** 203–229.

**Liu, C.W., Li, X.H., Thompson, D., Wooding, K., Chang, T., Tang, Z., Yu, H., Thomas, P.J., & DeMartino, G.N.** (2006) ATP binding and ATP hydrolysis play distinct roles in the function of 26S proteasome. *Mol. Cell* **24**, 39–50.

**Luzio, J.P., Pryor, P.R., & Bright, N.A.** (2007) Lysosomes: fusion and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 622–632.

**Mayor, S. & Pagano, R.E.** (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 603–612.

**McMahon, H.T. & Boucrot, E.** (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 517–533.

**Pickart, C.M. & Cohen, R.E.** (2004) Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 177–187.

**Royle, S.J.** (2006) The cellular functions of clathrin. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 1823–1832.

**Schekman, R.** (2007) How sterols regulate protein sorting and traffic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 6496–6497.

**Stewart, M.** (2007) Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 195–208.

**Strambio-De-Castillia, C., Niepel, M., & Rout, M.P.** (2010) The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 490–501.

**Tasaki, T., Sriram, S.M., Park, K.S., & Kwon, Y.T.** (2012) The N-end rule pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 261–289.

## Problemas

**1. Tradução do RNA mensageiro** Quais seriam as sequências de aminoácidos dos peptídeos formados pelos ribossomos em resposta às seguintes sequências de mRNA, considerando que a fase de leitura inicia com as três primeiras bases em cada sequência?

(a) GGUCAGUCGCUCCUGAUU
(b) UUGGAUGCGCCAUAAUUUGCU
(c) CAUGAUGCCUGUUGCUAC
(d) AUGGACGAA

**2. Quantas sequências diferentes de mRNA podem especificar uma sequência de aminoácido?** Escreva todas as sequências possíveis de mRNA que podem codificar o simples segmento tripeptídico Leu-Met-Tyr. A sua resposta lhe dará uma ideia sobre o número de possíveis mRNA capazes de codificar um polipeptídeo.

**3. A sequência de bases de um mRNA pode ser predita a partir da sequência de aminoácidos de seu produto polipeptídico?** Se o quadro de leitura for especificado, uma dada sequência de bases de um mRNA codificará uma – e apenas uma – sequência de aminoácidos em um polipeptídeo. A partir de uma dada sequência de resíduos de aminoácidos em uma proteína, como, por exemplo, o citocromo *c*, é possível predizer uma sequência única de bases do seu mRNA codificante? Dê razões para sua resposta.

**4. Codificação de um polipeptídeo a partir de DNA fita dupla.** A fita-molde de um segmento de DNA dupla-hélice contém a sequência

(5′) CTTAACACCCCTGACTTCGCGCCGTCG(3′)

(a) Qual é a sequência de bases do mRNA que pode ser transcrita a partir dessa fita?

(b) Que sequência de aminoácidos poderia ser codificada pelo mRNA em (a), iniciando na extremidade 5′?

(c) Se a fita complementar (não molde) desse DNA fosse transcrita e traduzida, a sequência de aminoácidos resultante seria a mesma que em (b)? Explique o significado biológico da sua resposta.

**5. A metionina tem apenas um códon.** A metionina é um dos dois aminoácidos com apenas um códon. Como é que o único códon que codifica a metionina especifica tanto o resíduo inicial como os resíduos de Met internos dos polipeptídeos sintetizados pela *E. coli*?

**6. mRNAs sintéticos.** O código genético foi elucidado com polirribonucleotídeos sintetizados enzimaticamente ou quimicamente em laboratório. Considerando o atual conhecimento sobre o código genético, como você faria um polirribonucleotídeo que pudesse servir como um mRNA codificando predominantemente muitos resíduos Phe e um pequeno número de resíduos Leu e Ser? Que outro(s) aminoácido(s) poderia(m) ser codificado(s) por esse polirribonucleotídeo, mas em menores quantidades?

**7. Custo energético da biossíntese de proteínas.** Determine o mínimo de energia necessário, em termos de equivalentes de ATP utilizados, para a biossíntese da cadeia de $\beta$-globina da hemoglobina (146 resíduos), tendo como componentes de partida todos os aminoácidos necessários, ATP e GTP. Compare sua resposta com a quantidade de energia gasta para a biossíntese de uma cadeia linear de glicogênio de 146 resíduos de glicose unidos por ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$), a partir de um conjunto de precursores incluindo glicose, UTP e ATP (Capítulo 15). Com base nos seus dados, qual é o custo *extra* de energia para se produzir uma proteína na qual todos os resíduos estão ordenados em uma sequência específica, quando comparado com o custo de se produzir um polissacarídeo com o mesmo número de resíduos, mas sem o conteúdo de informação da proteína?

Além do custo direto de energia para a síntese de uma proteína, existem gastos indiretos de energia – aqueles requeridos para que a célula produza as enzimas necessárias para a síntese proteica. Compare a magnitude dos custos indiretos para que uma célula eucariótica realize a biossíntese de cadeias de glicogênio lineares ($\alpha 1 \rightarrow 4$) e a biossíntese de polipeptídeos, em termos de maquinarias enzimáticas envolvidas.

**8. Pressupondo anticódons a partir de códons.** A maioria dos aminoácidos tem mais de um códon e se liga a mais de um tRNA, cada qual com um anticódon diferente. Escreva todos os anticódons possíveis para os quatro códons de glicina: (5′)GGU, GGC, GGA e GGG.

(a) Com base na sua resposta, quais posições, nos anticódons, são as principais determinantes para a especificidade dos seus códons, no caso da glicina?

(b) Qual(is) pareamento(s) códon-anticódon possui(em) um par de bases oscilante?

(c) Em qual dos pareamentos códon-anticódon todas as três posições apresentam fortes ligações de hidrogênio de Watson-Crick?

**9. Efeito das mudanças em uma única base para a sequência de aminoácidos.** Muitas evidências importantes que confirmam o código genético surgiram analisando-se as mudanças nas sequências de aminoácidos de proteínas mutantes após a alteração de uma única base no gene que codifica a proteína. Quais das seguintes substituições de aminoácidos seriam consistentes com o código genético no caso de as alterações terem sido causadas pela mudança de uma única base? Quais não resultam de uma única mudança de base? Por quê?

(a) Phe→Leu
(b) Lys→Ala
(c) Ala→Thr
(d) Phe→Lys
(e) Ile→Leu
(f) His→Glu
(g) Pro→Ser

**10. A resistência do código genético às mutações.** A sequência de RNA abaixo representa o início de uma fase de leitura. Que alterações podem ocorrer em cada posição sem que haja mudança no aminoácido codificado?

(5′) AUGAUAUUGCUAUCUUGGACU

**11. Princípio da mutação das células falciformes.** A hemoglobina das células falciformes tem um resíduo de Val na posição 6 da cadeia da $\beta$-globina, em vez do resíduo de Glu encontrado na hemoglobina A normal. Você seria capaz de predizer qual mudança ocorreu no códon de DNA para glutamato que causou a substituição do Glu pela Val?

**12. Edição pelas aminoacil-tRNA-sintases.** A isoleucil--tRNA-sintase apresenta uma função de revisão que garante a fidelidade da reação de aminoacilação, mas a histidil-tRNA--sintase não tem essa função. Explique.

**13. A importância de um "segundo código genético".** Algumas aminoacil-tRNA-sintases não reconhecem e não se ligam ao anticódon de seus tRNA correspondentes, mas usam outras características estruturais dos tRNA para conferir a especificidade de ligação. Os tRNA para alanina aparentemente se encaixam nessa categoria.

(a) Quais características do $tRNA^{Ala}$ são reconhecidas pela Ala-tRNA-sintase?

(b) Descreva as consequências da mutação C→G na terceira posição do anticódon do $tRNA^{Ala}$.

(c) Que outros tipos de mutação podem ter efeitos semelhantes?

(d) Mutações desses tipos nunca são encontradas em populações naturais de organismos. Por quê? (Dica: considere o que poderia ocorrer tanto em proteínas individuais como no organismo como um todo.)

**14. O papel dos fatores de tradução.** Um pesquisador isolou variantes mutantes dos fatores de transcrição bacterianos IF-2, EF-Tu e EF-G. Em cada caso, a mutação permite o enovelamento apropriado da proteína e a ligação de GTP, mas não permite a hidrólise do GTP. Em qual etapa a tradução seria bloqueada por cada proteína mutante?

**15. Mantendo a fidelidade da síntese proteica.** Os mecanismos químicos utilizados para evitar erros na síntese proteica são diferentes daqueles utilizados durante a replicação do DNA. As DNA-polimerases fazem uso da atividade de edição exonucleásica 3′→5′ para remover nucleotídeos pareados incorretamente inseridos em uma fita de DNA nascente. Não existe função de edição análoga nos ribossomos, e, de fato, a identidade de um aminoácido em um tRNA que chega no ribossomo e que é ligado ao polipeptídeo nascente nunca é conferida. Uma etapa

de revisão que hidrolisasse a recém-formada ligação peptídica depois que um aminoácido incorreto tivesse sido inserido em um polipeptídeo nascente (análoga à etapa de edição das DNA-polimerases) não seria prática. Por quê? (Dica: Considere como a ligação entre o polipeptídeo nascente e o mRNA é mantida durante o alongamento; ver Figuras 27-29 e 27-30.)

**16. Deduzindo a localização celular de uma proteína.** O gene para um polipeptídeo eucariótico de 300 resíduos de aminoácidos é alterado de forma que a sequência sinal reconhecida pela SRP fica na extremidade aminoterminal do polipeptídeo, e um sinal de localização nuclear (NLS) existe na região interna, iniciando no resíduo 150. Em que local da célula essa proteína é provavelmente encontrada?

**17. Exigências para o transporte de proteínas através da membrana.** A proteína OmpA secretada por bactérias tem um precursor, ProOmpA, o qual tem a sequência sinal aminoterminal necessária para a secreção. Se a ProOmpA purificada é desnaturada com ureia 8 M, e a ureia é posteriormente removida (p. ex., passando rapidamente a solução proteica por uma coluna de gel-filtração), a proteína pode ser transportada, *in vitro*, através de membranas bacterianas internas isoladas. No entanto, o transporte se torna impossível se a ProOmpA for primeiro incubada por algumas horas na ausência de ureia. Além disso, a capacidade de transporte é mantida por um período mais longo se a ProOmpA for antes incubada na presença de outra proteína bacteriana denominada fator de desencadeamento. Descreva a provável função desse fator.

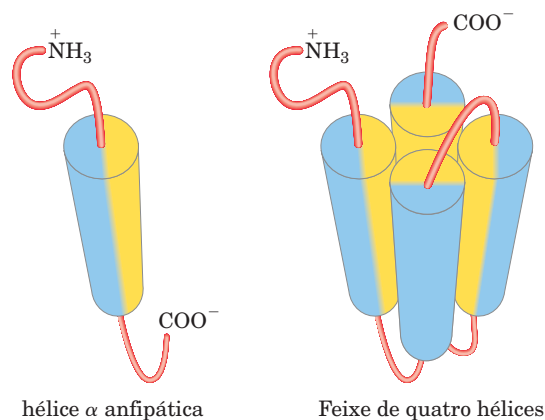
**18. Capacidade de codificação de proteínas de um DNA viral.** O genoma de 5.386 pb do bacteriófago $\phi$X174 inclui genes para 10 proteínas, designadas de A a K, com os tamanhos mostrados na tabela a seguir. Quanto DNA seria necessário para codificar essas 10 proteínas? Como você conciliaria o tamanho do genoma do $\phi$X174 com sua capacidade de codificar proteínas?

| Proteína | Número de resíduos de aminoácidos | Proteína | Número de resíduos de aminoácidos |
|---|---|---|---|
| A | 455 | F | 427 |
| B | 120 | G | 175 |
| C | 86 | H | 328 |
| D | 152 | I | 38 |
| E | 91 | J | 56 |

## Problema de análise de dados

**19. Desenhando proteínas pela utilização de genes gerados ao acaso.** Estudos acerca das sequências de aminoácidos e das correspondentes estruturas tridimensionais de proteínas nativas e mutantes levaram a elucidações significativas sobre os princípios que governam o enovelamento de proteínas. Uma maneira importante para testar essas ideias seria *desenhar* uma proteína com base nesses princípios e verificar se ela se dobra conforme esperado.

Kamtekar e colaboradores (1993) se basearam em aspectos do código genético para gerar sequências aleatórias de proteínas, com padrões definidos de resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos. A elegante abordagem empregada combinava o conhecimento acerca da estrutura de proteínas, das propriedades dos aminoácidos e do código genético para investigar fatores que influenciam a estrutura das proteínas.

Eles se propuseram a gerar um conjunto de proteínas com a estrutura simples de quatro hélices, mostrada no final do parágrafo, com hélices $\alpha$ (mostradas como cilindros) conectadas por segmentos de alças aleatórias (em vermelho-claro). Cada hélice $\alpha$ é anfipática – os grupos R de um lado da hélice são exclusivamente hidrofóbicos (em amarelo), e aqueles do outro lado são exclusivamente hidrofílicos (em azul). Seria de se esperar que uma proteína consistindo em quatro dessas hélices, separadas por curtos segmentos de alças aleatórias, se dobrasse de forma que os lados hidrofílicos das hélices ficariam voltados para o solvente.

(a) Que forças ou interações mantêm as quatro hélices $\alpha$ unidas nessa estrutura?

A Figura 4-4a mostra um segmento de hélice $\alpha$ consistindo em 10 resíduos de aminoácidos. Com o bastão central cinza atuando como um divisor, quatro dos grupos R (esferas púrpura) se estendem a partir do lado esquerdo da hélice e seis a partir do lado direito.

(b) Numere os grupos R na Figura 4-4a, da parte superior (aminoterminal; 1) para a parte inferior (carboxiterminal; 10). Quais grupos R se estendem a partir do lado esquerdo e quais a partir do lado direito?

(c) Suponha que você quisesse desenhar esse segmento de 10 aminoácidos a fim de montar uma hélice anfipática, com o lado esquerdo hidrofílico e o lado direito hidrofóbico. Forneça uma sequência de 10 aminoácidos que potencialmente se dobraria em tal estrutura. Há muitas respostas corretas para esta questão.

(d) Forneça uma sequência de DNA fita dupla que poderia codificar a sequência de aminoácidos que você escolheu em (c). (Sendo a região interna de uma proteína, você não precisa incluir códons iniciadores nem de término.)

Em vez de desenhar proteínas com sequências específicas, Kamtekar e colaboradores desenharam proteínas com sequências parcialmente aleatórias, com resíduos de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos posicionados em um padrão controlado. Para isso, eles utilizaram algumas características interessantes do código genético para construir uma biblioteca de moléculas de DNA sintético com sequências parcialmente aleatórias, organizadas seguindo um padrão específico.

Para desenhar uma sequência de DNA que codificasse sequências aleatórias de aminoácidos hidrofóbicos, os pesquisadores iniciaram pelo códon degenerado NTN, no qual N pode ser A, G, C ou T. Eles preencheram cada posição N incluindo uma mistura equimolar de A, G, C e T na reação de síntese de DNA, a fim de gerar uma mistura de moléculas de DNA com diferentes nucleotídeos nesta posição (ver Figura 8-35). De

forma semelhante, para codificar sequências aleatórias de aminoácidos polares, eles partiram do códon degenerado NAN e usaram uma mistura equimolar de A, G e C (mas, nesse caso, sem o T) para preencher as posições N.

(e) Quais aminoácidos podem ser codificados pelo triplete NTN? Nesse grupo, todos os aminoácidos são hidrofóbicos? O grupo inclui *todos* os aminoácidos hidrofóbicos?

(f) Quais aminoácidos podem ser codificados pelo triplete NAN? Todos esses aminoácidos são polares? O grupo inclui *todos* os aminoácidos polares?

(g) Ao criar os códons NAN, por que foi necessário deixar T fora da mistura de reação?

Kamtekar e colaboradores clonaram essa biblioteca de sequências aleatórias de DNA em plasmídeos, selecionaram 48 que produziam o padrão correto de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos e os expressaram em *E. coli*. O desafio seguinte era determinar se as proteínas se dobravam conforme o esperado. Seria muito demorado expressar cada proteína, cristalizá-la e determinar a sua estrutura tridimensional completa. Em vez disso, os pesquisadores utilizaram a maquinaria de processamento proteico de *E. coli* para excluir as sequências que levavam à produção de proteínas muito defeituosas. Nessa fase seletiva inicial, eles mantiveram apenas aqueles clones que resultaram em uma banda de proteínas com o peso molecular esperado na análise por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (ver Figura 3-18).

(h) Por que uma proteína grosseiramente mal dobrada não formaria uma banda com o peso molecular esperado, quando analisada eletroforeticamente?

Várias proteínas passaram nesse teste inicial, e análises mais aprofundadas mostraram que elas apresentavam, de fato, a estrutura de quatro hélices prevista.

(i) Por que nem todas as proteínas com sequências aleatórias que passaram no primeiro teste seletivo produziram estruturas de quatro hélices?

## Referência

**Kamtekar, S., Schiffer, J.M., Xiong, H., Babik, J.M., & Hecht, M.H.** (1993) Protein design by binary patterning of polar and nonpolar amino acids. *Science* **262**, 1680–1685.

28

# Regulação da Expressão Gênica



Dos aproximadamente 4.000 genes no genoma bacteriano típico, ou talvez dos 25.000 genes no genoma humano, apenas uma fração é expressa em uma célula em dado momento. Alguns produtos gênicos estão presentes em grandes quantidades: os fatores de alongamento necessários à síntese proteica, por exemplo, estão entre as mais abundantes proteínas em bactérias, e a ribulose-1,5--bifosfato-carboxilase/oxigenase (rubisco) de plantas e bactérias fotossintéticas é, até onde se sabe, a enzima mais abundante na biosfera. Outros produtos gênicos ocorrem em quantidades muito menores; por exemplo, uma célula pode conter apenas poucas moléculas de enzimas que reparam lesões raras do DNA. As necessidades de certos produtos gênicos mudam ao longo do tempo. A necessidade de enzimas em certas vias metabólicas aumenta ou diminui à medida que as fontes de alimentos mudam ou se esgotam. Durante o desenvolvimento de um organismo pluricelular, algumas proteínas que influenciam a diferenciação celular estão presentes apenas por um breve período em apenas poucas células.

A especialização da função celular afeta drasticamente a necessidade de vários produtos gênicos; um exemplo é a concentração excepcionalmente elevada de uma única proteína – hemoglobina – em eritrócitos. Dado o alto custo da síntese proteica, a regulação da expressão gênica é essencial para otimizar a utilização da energia disponível.

A concentração celular de uma proteína é determinada pelo equilíbrio delicado de ao menos sete processos, cada um tendo vários pontos de regulação potenciais:

1. Síntese do transcrito de RNA primário (transcrição)
2. Modificação pós-transcricional do mRNA
3. Degradação do RNA mensageiro
4. Síntese proteica (tradução)
5. Modificação pós-traducional de proteínas
6. Direcionamento e transporte de proteínas
7. Degradação de proteínas

Esses processos estão resumidos na **Figura 28-1**. Vários desses mecanismos foram examinados em capítulos anteriores. A modificação pós-transcricional do mRNA por processos como padrões alternativos de *splicing* (ver Figura 26-21) ou edição de RNA (ver Figuras 27-10, 27-12) pode afetar quais proteínas são produzidas a partir de um transcrito de mRNA e em que quantidades. Uma variedade de sequências de nucleotídeos em um mRNA pode afetar a velocidade da sua degradação (p. 1084). Muitos fatores afetam a velocidade em que um mRNA é traduzido em uma proteína, bem como a modificação pós-traducional, direcionamento e, por fim, degradação daquela proteína (Capítulo 27).

Dos processos regulatórios ilustrados na Figura 28-1, aqueles operando no nível da iniciação da transcrição são particularmente bem documentados. Esses processos são um foco importante deste capítulo, embora outros mecanismos também sejam considerados. Pesquisadores continuam a descobrir mecanismos regulatórios complexos e algumas vezes surpreendentes, levando a uma crescente apreciação da importância da regulação pós-transcricional e da tradução, especialmente em eucariotos. Em vários genes, os processos regulatórios são elaborados e redundantes e envolvem um investimento considerável de energia química.

O controle da iniciação da transcrição permite a regulação sincronizada de múltiplos genes codificando produtos com atividades interdependentes. Por exemplo, quando seu DNA está muito danificado, as células bacterianas precisam de um aumento coordenado nos níveis das muitas enzimas de reparo de DNA. Talvez a forma mais sofisticada de coordenação ocorra nos complexos circuitos regulatórios que guiam o desenvolvimento dos eucariotos multicelulares e envolvem muitos tipos de mecanismos regulatórios.

Primeiramente são examinadas as interações entre proteínas e DNA que são a chave para a regulação da transcrição. Em seguida, são abordadas as proteínas específicas que influenciam a expressão de genes específicos, primeiro em células bacterianas e, então, em células de eucariotos. Quando for relevante, são incluídas informações sobre a regulação pós-transcricional e de tradução, com o objetivo de fornecer uma visão geral mais completa da rica complexidade dos mecanismos regulatórios.

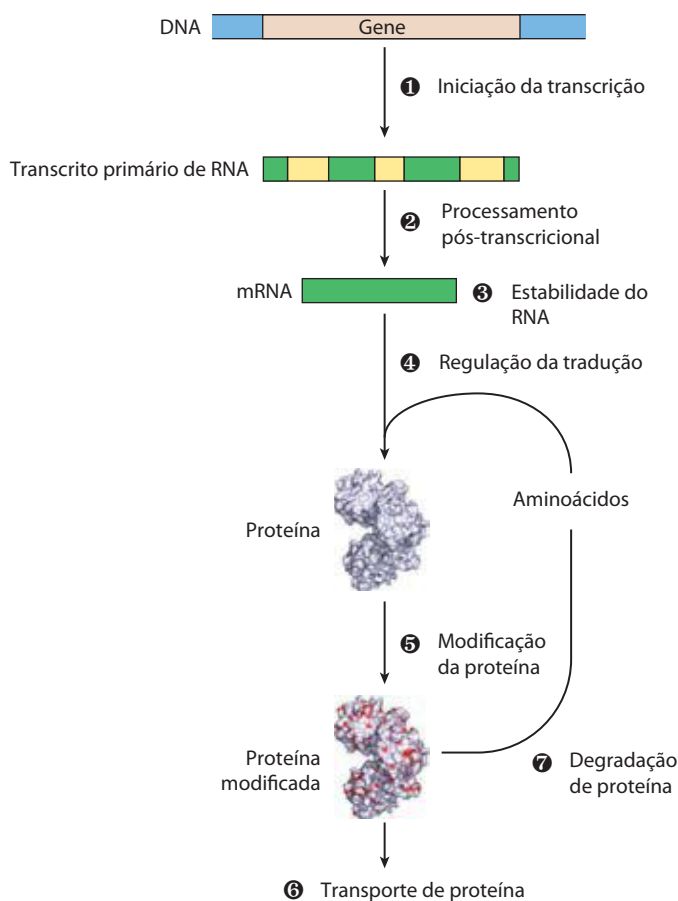



**FIGURA 28-1 Sete processos que afetam a concentração do estado estacionário de uma proteína.** Cada processo tem vários pontos potenciais de regulação.

## 28.1 Princípios da regulação gênica

Genes para produtos necessários em todos os momentos, como os das enzimas das vias metabólicas centrais, são expressos em nível mais ou menos constante em praticamente todas as células de uma espécie ou organismo. Muitas vezes, esses genes são chamados de **genes constitutivos** (*housekeeping genes*). A expressão invariável de um gene é chamada de **expressão do gene constitutivo**.

Para outros produtos gênicos, os níveis celulares aumentam e diminuem em resposta a sinais moleculares; isso é a **expressão gênica regulada**. Produtos gênicos que aumentam de concentração sob circunstâncias moleculares específicas são chamados de **induzíveis**; o processo de aumentar sua expressão é a **indução**. A expressão de muitos dos genes codificadores de enzimas de reparo de DNA, por exemplo, é induzida por um sistema de proteínas reguladoras que responde aos altos níveis de dano ao DNA. Ao contrário, produtos gênicos que diminuam em concentração em resposta a um sinal molecular são denominados **repressíveis**, e o processo chamado de **repressão**. Por exemplo, em bactérias, amplas fontes de triptofano levam à repressão dos genes para as enzimas que catalisam a biossíntese do triptofano.

A transcrição é mediada e regulada por interações proteína-DNA, especialmente aquelas envolvendo os componentes proteicos da RNA-polimerase (Capítulo 26). Primeiro será considerado como a atividade da RNA-polimerase é regulada e procede-se a uma descrição geral das proteínas participando nessa regulação. Examina-se então a base molecular para o reconhecimento de sequências de DNA específicas por proteínas ligantes de DNA.

### A RNA-polimerase se liga ao DNA nos promotores

A RNA-polimerase se liga ao DNA e inicia a transcrição nos promotores (ver Figura 26-5), sítios geralmente encontrados perto de pontos em que a síntese de RNA começa no molde de RNA. A regulação da iniciação da transcrição frequentemente envolve alterações em como a RNA-polimerase se interage com um promotor.

As sequências de nucleotídeos de promotores variam consideravelmente, afetando a afinidade de ligação das RNA-polimerases e, portanto, a frequência de iniciação da transcrição. Alguns genes de *Escherichia coli* são transcritos uma vez por segundo, outros menos de uma vez por geração celular. A maior parte dessa variação se deve a diferenças na sequência dos promotores. Na ausência de proteínas regulatórias, diferenças na sequência dos promotores podem afetar a frequência de iniciação da transcrição em 1.000 vezes ou mais. A maioria dos promotores de *E. coli* tem uma sequência próxima de um consenso (**Figura 28-2**). Mutações que resultem em uma mudança que se afaste da sequência consenso geralmente diminuem a função do promotor; ao contrário, mutações na direção do consenso geralmente estimulam a função do promotor.

**CONVENÇÃO-CHAVE:** Por convenção, as sequências de DNA são apresentadas conforme existem na fita não molde, com a terminação 5′ à esquerda. Os nucleotídeos são numerados a partir do sítio de início da transcrição, com números positivos à direita (na direção da transcrição) e números negativos à esquerda. N indica qualquer nucleotídeo. ■

Embora os genes constitutivos sejam expressos constitutivamente, as concentrações celulares das proteínas

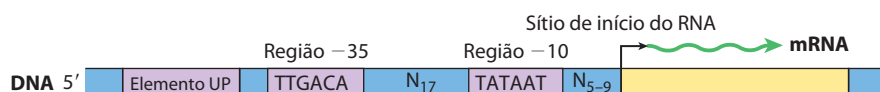



**FIGURA 28-2 Sequência consensual para vários promotores de *E. coli*.** A maioria das substituições de bases nas regiões –10 e –35 tem um efeito negativo no funcionamento do promotor. Alguns promotores também incluem o elemento UP (promotor a montante) (ver Figura 26-5).

que eles codificam variam amplamente. Para esses genes, a interação RNA-polimerase-promotor influencia fortemente a velocidade de iniciação da transcrição; diferenças na sequência dos promotores permitem que a célula sintetize o nível apropriado de cada produto dos genes constitutivos.

A taxa basal de iniciação da transcrição nos promotores dos genes constitutivos também é determinada pela sequência dos promotores, mas a expressão desses genes é modulada adicionalmente por proteínas regulatórias. Muitas dessas proteínas operam estimulando ou interferindo na interação entre a RNA-polimerase e o promotor.

As sequências dos promotores eucarióticos é mais variável do que a dos seus correspondentes bacterianos (ver Figura 26-8). As três RNA-polimerases eucarióticas geralmente precisam de uma série de fatores de transcrição gerais para se ligar a um promotor.

Contudo, como na expressão gênica bacteriana, o nível basal de transcrição é determinado pelo efeito das sequências promotoras no funcionamento da RNA-polimerase e seus fatores de transcrição apropriados.

## A iniciação da transcrição é regulada por proteínas que se ligam aos promotores ou que estão próximas deles

Pelo menos três tipos de proteínas regulam a iniciação da transcrição pela RNA-polimerase: **fatores de especificidade** alteram a especificidade da RNA-polimerase para um determinado promotor ou conjuntos de promotores **repressores** impedem o acesso da RNA-polimerase ao promotor, e os **ativadores** estimulam a interação RNA-polimerase-promotor.

Os fatores de especificidade bacterianos foram apresentados no Capítulo 26 (ver Figura 26-5), embora não tenham sido referidos pelo nome. A subunidade $\sigma$ da holoenzima RNA-polimerase de *E. coli* é um fator de especificidade que controla o reconhecimento e a ligação do promotor. A maioria dos promotores de *E. coli* é reconhecida por uma única subunidade $\sigma$ ($M_r$ 70.000), $\sigma^{70}$. Sob certas condições, algumas das subunidades $\sigma^{70}$ são substituídas por um de seis outros fatores de especificidade. Um caso notável surge quando as bactérias são submetidas ao estresse por calor, levando à substituição de $\sigma^{70}$ por $\sigma^{32}$ ($M_r$ 32.000).

Quando ligada a $\sigma^{32}$, a RNA-polimerase é direcionada a um conjunto especializado de promotores com uma sequência consensual diferente (**Figura 28-3**). Esses promotores controlam a expressão de um conjunto de genes que codificam proteínas, incluindo algumas proteínas chaperonas (p. 146), que são parte de um sistema induzido por estresse chamado de resposta de choque térmico. Portanto, por meio de mudanças na afinidade de ligação da polimerase que a dirigem para diferentes promotores, um conjunto de genes envolvido em processos relacionados é regulado coordenadamente. Em células eucarióticas, alguns dos fatores de transcrição gerais, em particular a proteína de ligação TATA (TBP; ver Figura 26-9), podem ser considerados como fatores de especificidade.

Os repressores se ligam a sítios específicos no DNA. Em células bacterianas, tais sítios de ligação, chamados **operadores**, estão geralmente próximos de um promotor. A ligação da RNA-polimerase, ou seu movimento ao longo do DNA após sua ligação a ele, é bloqueada quando o repressor está presente. A regulação pela proteína repressora que bloqueia a transcrição é chamada de **regulação negativa**. A ligação do repressor ao DNA é regulada por um sinal molecular (ou **efetor**), geralmente uma molécula pequena ou uma proteína, que se liga ao repressor e provoca uma mudança conformacional. A interação entre repressor e molécula sinalizadora aumenta ou diminui a transcrição. Em alguns casos, a mudança conformacional resulta na dissociação de um repressor ligado ao DNA do operador (**Figura 28-4a**).

A iniciação da transcrição pode então proceder sem obstáculos. Em outros casos, a interação entre um repressor inativo e a molécula sinalizadora leva o repressor a se ligar ao operador (Figura 28-4b). Nas células eucarióticas, o sítio de ligação para um repressor pode se encontrar a alguma distância do promotor. A ligação desses repressores aos seus sítios de ligação tem o mesmo efeito que em células bacterianas: inibir a montagem ou atividade de um complexo de transcrição no promotor. Os ativadores fornecem um contraponto molecular aos repressores; eles se ligam ao DNA e *estimulam* a atividade da RNA-polimerase em um promotor; trata-se da **regulação positiva**. Em bactérias, muitas vezes, os sítios de ligação ativadores são adjacentes aos promotores ligados fracamente ou não ligados à RNA-polimerase isolada, de modo que ocorre pouca transcrição na ausência do ativador. Muitos ativadores eucarióticos se ligam aos sítios de DNA, chamados potenciadores (*enhancers*), que estão muito distantes do promotor. Esses ativadores afetam a taxa de transcrição em um promotor que pode estar localizado a milhares de pares de bases de distância.

Alguns ativadores são geralmente ligados ao DNA, estimulando a transcrição até que a dissociação do ativador seja disparada pela ligação de uma molécula sinalizadora (Figura 28-4c). Em outros casos, o ativador se liga ao DNA apenas após a interação com uma molécula sinalizadora (Figura 28-4d). Moléculas sinalizadoras podem, portanto,

**FIGURA 28-3 Sequência consensual para promotores que regulam a expressão de genes de choque térmico de *E. coli*.** Este sistema responde a aumentos de temperatura, bem como a outros estresses ambientais, resultando na indução de um conjunto de proteínas. A ligação da RNA-polimerase aos promotores do choque térmico é mediada por uma subunidade $\sigma$ da polimerase especializada, a $\sigma^{32}$, que substitui $\sigma^{70}$ no complexo de iniciação da RNA-polimerase.

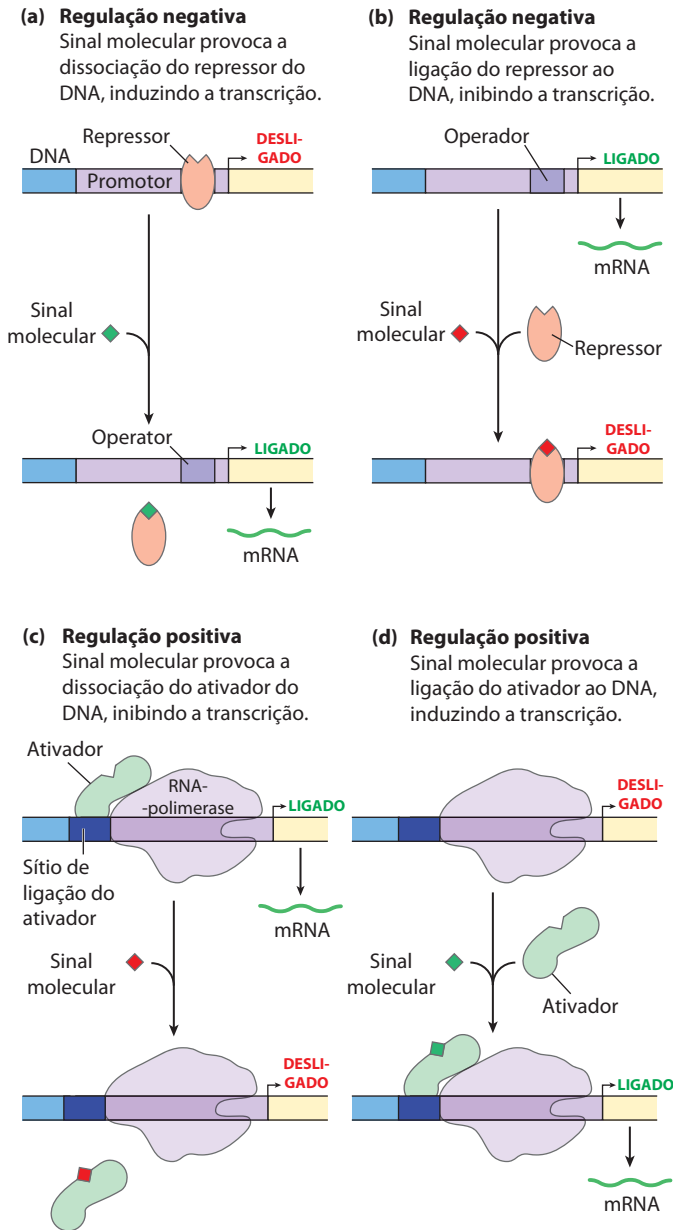



**FIGURA 28-4 Padrões comuns de regulação da iniciação da transcrição.** Dois tipos de regulação negativa são ilustrados. **(a)** O repressor se liga ao operador na ausência do sinal molecular; o sinal externo provoca a dissociação do repressor para permitir a transcrição **(b)** O repressor se liga na presença do sinal; o repressor se dissocia e a transcrição acontece quando o sinal é removido. A regulação positiva é mediada pelos ativadores do gene. Novamente, dois tipos são mostrados. **(c)** O ativador se liga na ausência do sinal molecular e a transcrição prossegue; quando o sinal é adicionado, o ativador se dissocia e a transcrição é inibida. **(d)** O ativador se liga na presença do sinal; ele se dissocia apenas quando o sinal é removido. Observe que as regulações "positiva" e "negativa" se referem ao tipo de proteína regulatória envolvida: a proteína ligada ou facilita ou inibe a transcrição. Em qualquer um dos casos, a adição de um sinal molecular aumenta ou diminui a transcrição, dependendo do seu efeito na proteína regulatória.

aumentar ou diminuir a transcrição, dependendo de como elas afetam o ativador. A regulação positiva é particularmente comum em eucariotos, como será visto.

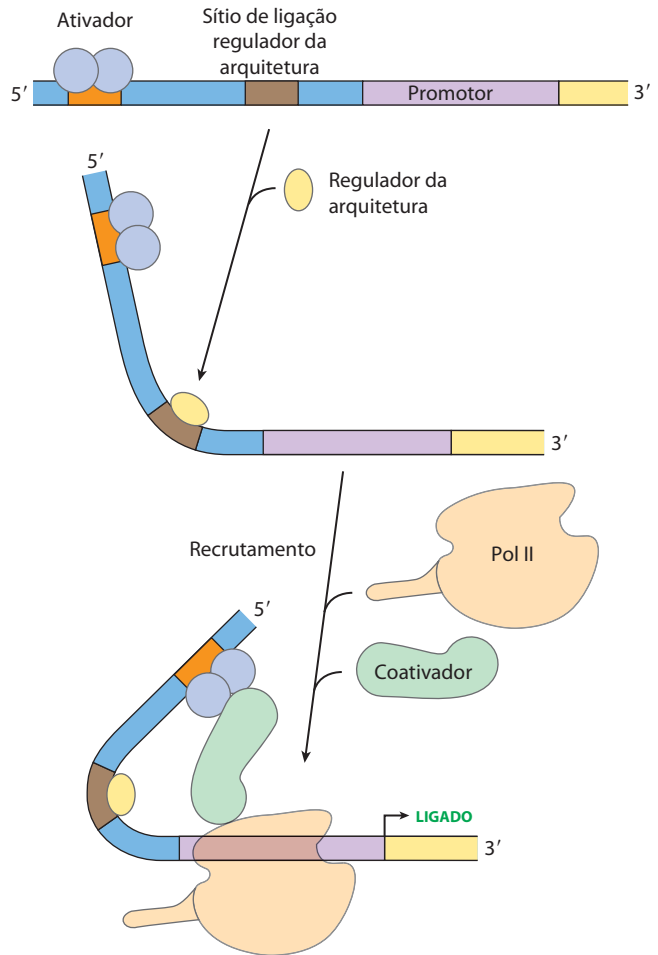



**FIGURA 28-5 A interação entre ativadores/repressores e a RNA--polimerase em eucariotos.** Com frequência, os ativadores e repressores eucarióticos se ligam a sítios a milhares de pares de bases de distância dos promotores que eles regulam. Alças de DNA, muitas vezes facilitadas por reguladores de arquitetura, colocam esses sítios em contato. A interação entre ativadores e a RNA-polimerase é frequentemente mediada por coativadores, como mostrado. A repressão é algumas vezes mediada por repressores (descritos posteriormente) que se ligam a ativadores, impedindo assim a interação ativadora com a RNA-polimerase.

Em eucariotos, a distância entre os sítios de ligação de ativadores ou repressores e promotores é superada fazendo alças (*looping*) no DNA entre eles (**Figura 28-5**). O processo de *looping* é facilitado em alguns casos por proteínas chamadas **reguladores arquitetônicos** que se ligam a sítios de intervenção e facilitam o *looping* do DNA. A maioria dos sistemas eucarióticos envolve ativadores de proteínas. A interação atual entre ativadores e a RNA-polimerase no promotor é frequentemente mediada por proteínas intermediárias chamadas coativadores. Em alguns casos, repressores proteicos podem tomar o lugar de coativadores, ligando-se aos ativadores e impedindo a interação ativadora.

## Muitos genes bacterianos são reunidos e regulados em óperons

As bactérias têm um mecanismo geral simples para coordenar a regulação de genes que codificam produtos que par-

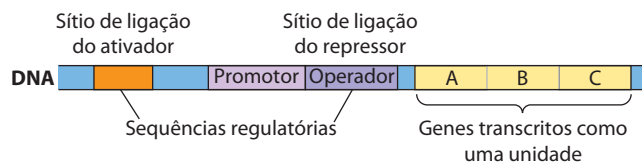



**FIGURA 28-6 Óperon de bactérias representativo.** Genes A, B e C são transcritos em um mRNA policistrônico. Sequências regulatórias típicas incluem sítios de ligação para proteínas que ativam ou reprimem a transcrição a partir do promotor.

ticipam em um conjunto de processos relacionados: esses genes estão reunidos no cromossomo e são transcritos juntos. Muitos mRNA bacterianos são policistrônicos – múltiplos genes em um único transcrito – e o único promotor que inicia a transcrição do grupo de genes é o local de regulação para a expressão de todos os genes no grupo. O grupo de genes e o promotor, acrescido de sequências adicionais que funcionam juntas na regulação, são chamados de **óperons** (**Figura 28-6**). Óperons que incluem dois a seis genes transcritos como uma unidade são comuns; alguns óperons contêm 20 ou mais genes.

Muitos dos princípios da expressão dos genes bacterianos foram definidos pela primeira vez por estudos do metabolismo da lactose em *E. coli*, que pode usar lactose como sua única fonte de carbono. Em 1960, François Jacob e Jacques Monod publicaram um breve artigo no periódico *Proceedings* da Academia Francesa de Ciências, descrevendo como dois genes adjacentes envolvidos no metabolismo da lactose eram regulados coordenadamente por um elemento genético localizado em uma extremidade do grupo de genes. Os genes eram os da β-galactosidase, que quebra a lactose em galactose e glicose, e os da galactosídeo-permease (lactose-permease, p. 416), que transporta lactose para o interior da célula (**Figura 28-7**). Os termos "óperon" e "operador" foram introduzidos pela primeira vez nesse artigo. Com o modelo óperon, a regulação gênica poderia, pela primeira vez, ser considerada em termos moleculares.

François Jacob, 1920-2013

Jacques Monod, 1910–1976

## O óperon *lac* está sujeito à regulação negativa

O óperon da lactose (*lac*) (**Figura 28-8a**) inclui os genes para β-galactosidase (*Z*), galactosídeo-permease (*Y*), e tiogalactosídeo-transacetilase (*A*). A última dessas enzimas parece modificar os galactosídeos tóxicos para facilitar sua remoção da célula. Cada um dos três genes é precedido por um sítio de ligação de ribossomos (não mostrado na Figura 28-8) que direciona independentemente a tradução daquele gene (Capítulo 27). A regulação do *lac* óperon pela proteína repressora do *lac* (Lac) segue o padrão destacado na Figura 28-4a.

O estudo dos mutantes *lac* óperon revelou alguns detalhes das atividades do sistema regulatório óperon. Na ausência de lactose, os genes *lac* óperon são reprimidos. Mutações no operador ou em outro gene, o gene *I*, resultam na síntese constitutiva de produtos gênicos. Quando o gene *I* está defeituoso, a repressão pode ser restaurada introduzindo-se um gene *I* funcional na célula em outra molécula de DNA, demonstrando que o gene *I* codifica uma molécula difusível que provoca a repressão gênica. Foi demonstrado que essa molécula é uma proteína, agora chamada de repressor Lac, um tetrâmero de monômeros idênticos. O operador ao qual ela se liga mais fortemente ($O_1$) é adjacente do sítio de início da transcrição (Figura 28-8a). O gene *I* é transcrito a partir do seu próprio promotor ($P_I$), independente dos genes óperon *lac*. O óperon

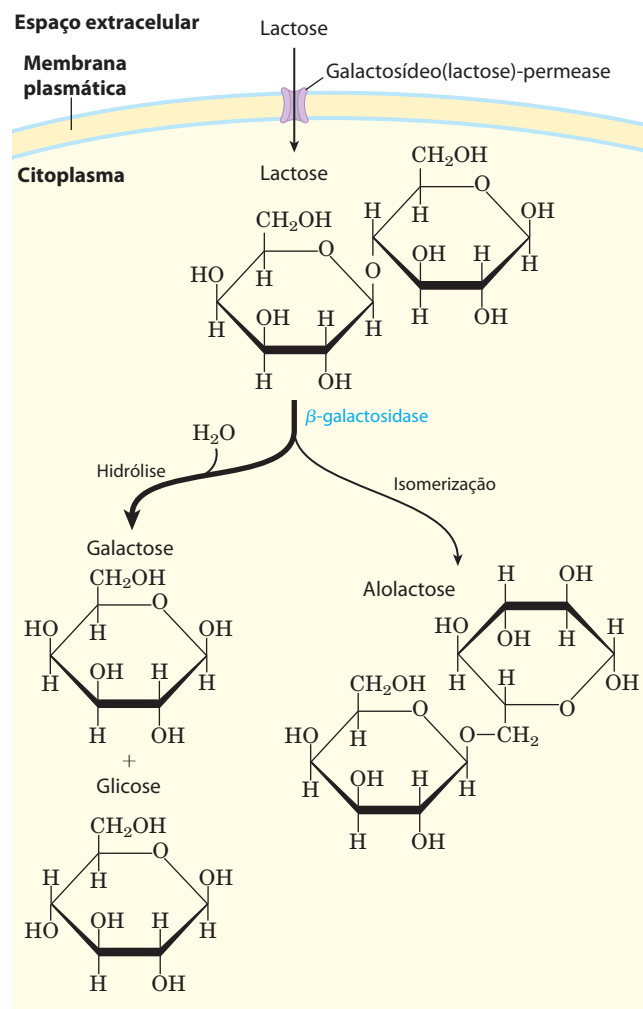



**FIGURA 28-7 Metabolismo da lactose em *E. coli*.** O consumo e o metabolismo de lactose precisam das atividades da galactosídeo(lactose)-permease e β-galactosidase. A conversão da lactose em alolactose por transglicosilação é uma reação secundária também catalisada pela β-galactosidase.

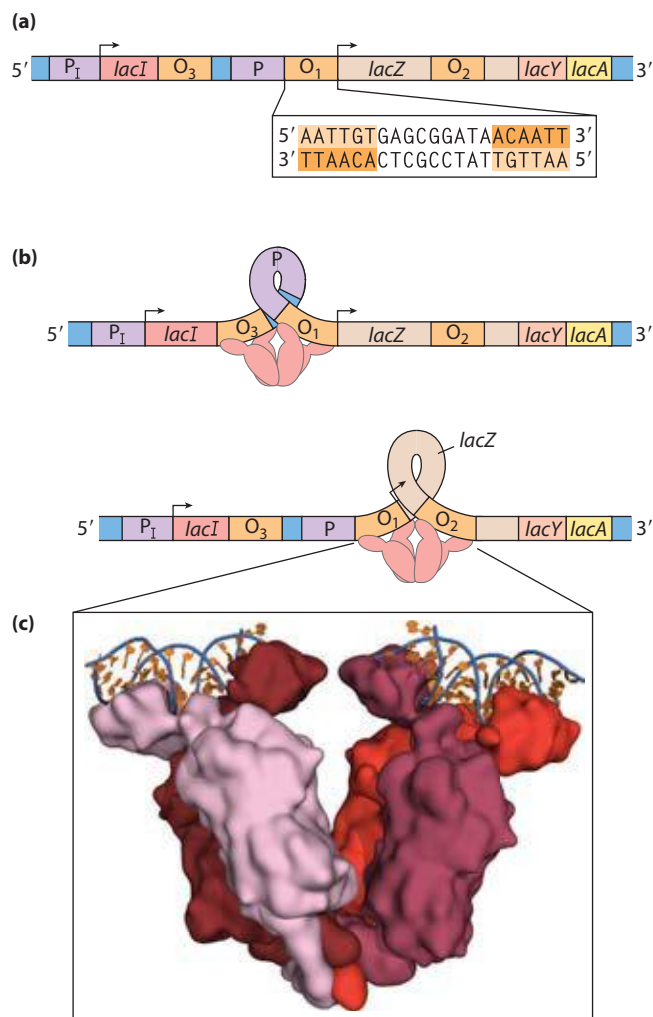



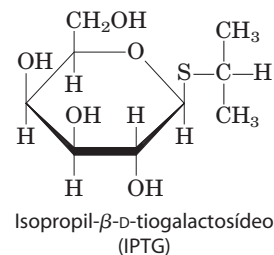
**FIGURA 28-8 O óperon *lac*.** **(a)** O óperon *lac*. O gene *lacI* codifica o repressor Lac. Os genes *lac Z*, *Y* e *A* codificam β-galactosidase, galactosídeo-permease e tiogalactosídeo-transacetilase, respectivamente. P é o promotor dos genes *lac* e $P_I$ é o promotor do gene *I*. $O_1$ é o operador principal do óperon *lac*; $O_2$ e $O_3$ são sítios operadores secundários de menos afinidade pelo repressor Lac. A repetição invertida a que o repressor Lac se liga em $O_1$ é mostrada no detalhe. **(b)** O repressor Lac se liga ao operador principal e a $O_2$ ou $O_3$, aparentemente formando uma alça no DNA. **(c)** (PDB ID 2PE5) O repressor Lac (cor salmão) é mostrado ligado a segmentos de DNA descontínuos e curtos (azul e cor de laranja).

*lac* tem dois sítios de ligação secundários para o repressor Lac. Um ($O_2$) está centralizado próximo da posição +410, no interior do gene que codifica a β-galactosidase (*Z*); o outro ($O_3$) está próximo da posição –90, dentro do gene *I*. Para reprimir o óperon, o repressor Lac parece se ligar tanto ao operador principal quanto a um de dois sítios secundários, com o DNA interveniente removido por *looping* (Figura 28-8b, c). Qualquer uma das duas ligações bloqueia a iniciação da transcrição.

Apesar desse elaborado complexo de ligação, a repressão não é absoluta. A ligação do repressor Lac reduz a velocidade de iniciação de transcrição em $10^3$ vezes. Se os sítios $O_2$ e $O_3$ forem eliminados por deleção ou mutação, apenas a ligação do repressor a $O_1$ reduz a transcrição em cerca de $10^2$ vezes. Mesmo no estado reprimido, cada célula tem algumas poucas moléculas de β-galactosidase e galactosídeo-permease, presumivelmente sintetizadas nas raras ocasiões em que o repressor se dissocia dos operadores. Esse nível basal de transcrição é essencial para a regulação do óperon. Quando as células recebem lactose, o óperon *lac* é induzido. Uma molécula indutora (sinal) se liga a um sítio específico no repressor Lac, provocando uma alteração conformacional que resulta na dissociação do repressor do operador. O indutor no sistema óperon *lac* não é a própria lactose, mas a alolactose, um isômero da lactose (Figura 28-7). Depois de entrar na célula de *E. coli* (por meio das poucas moléculas de lactose-permease existentes), a lactose é convertida em alolactose por uma das poucas moléculas existentes de β-galactosidase. A liberação do operador pelo repressor Lac, disparada à medida que o repressor se liga à alolactose, permite a expressão dos genes do óperon *lac* e leva a um aumento de $10^3$ vezes na concentração de β-galactosidase.

Vários β-galactosídeos relacionados estruturalmente à alolactose são indutores do óperon *lac*, mas não são substratos para a β-galactosidase; outros são substratos, mas não indutores. Um indutor muito eficaz e não metabolizável do óperon *lac*, frequentemente usado de modo experimental, é o isopropil-tiogalactosídeo (IPTG).

$CH_2OH$; O; OH; H; OH; H; H; H; OH; S—C—H; $CH_3$; $CH_3$

Isopropil-β-D-tiogalactosídeo (IPTG)

Um indutor que não pode ser metabolizado permite que os pesquisadores explorem a função fisiológica da lactose como uma fonte de carbono para o crescimento, separada da sua função na regulação da expressão gênica. Além da infinidade de óperons agora conhecidos em bactérias, alguns poucos óperons policistrônicos foram encontrados nas células de eucariotos inferiores. Nas células dos eucariotos superiores, entretanto, quase todos os genes codificadores de proteínas são transcritos separadamente.

Os mecanismos pelos quais os óperons são regulados podem variar significativamente do modelo simples apresentado na Figura 28-8. Mesmo o óperon *lac* é mais complexo do que indicado aqui, com um ativador contribuindo também para o esquema geral, como será visto na Seção 28.2. Antes de qualquer discussão adicional sobre os níveis de regulação da expressão gênica, entretanto, serão examinadas as interações moleculares críticas entre as proteínas de ligação do DNA (tais como repressores e ativadores) e as sequências de DNA às quais elas se ligam.

## Proteínas regulatórias têm domínios separados de ligação de DNA

As proteínas regulatórias geralmente se ligam a sequências de DNA específicas. Sua afinidade por essas sequências-alvo é de aproximadamente $10^4$ a $10^6$ vezes maior que sua afinidade por qualquer outra sequência de DNA. A maio-

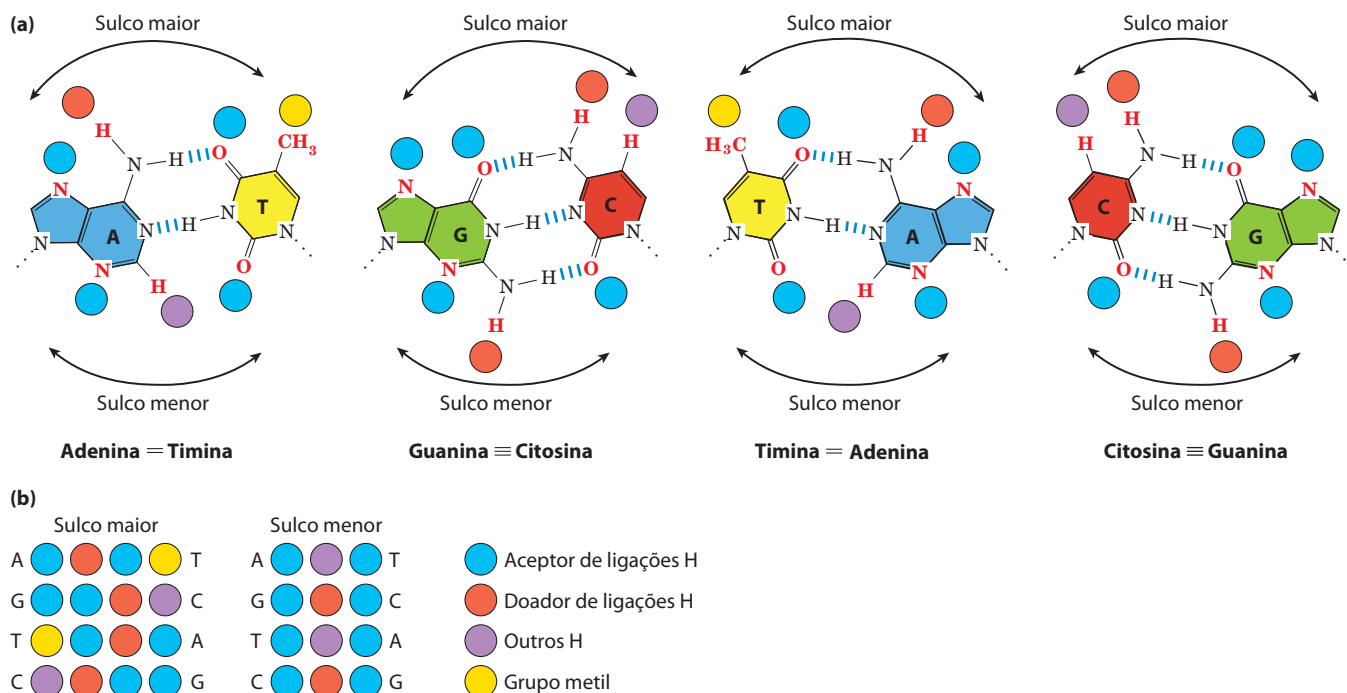



**FIGURA 28-9 Grupos no DNA disponíveis para ligação com proteínas. (a)** Aqui são mostrados grupos funcionais em todos os quatro pares de bases exibidos nos sulcos maior e menor do DNA (ver Figura 8-13). Átomos aceptores e doadores de ligações de hidrogênio são marcados por discos azuis ou vermelhos, respectivamente. Outros átomos de hidrogênio são marcados com discos roxos e grupos metil com discos amarelos. **(b)** Padrões de reconhecimento para cada par de bases, da esquerda para a direita, são resumidos na parte de baixo. A variação muito maior em padrões para o sulco maior dá origem a um poder diferenciador muito maior no sulco maior em relação ao sulco menor.

ria das proteínas regulatórias apresenta distintos domínios de ligação de DNA contendo subestruturas que interagem estreita e especificamente com o DNA. Esses domínios de ligação geralmente incluem um ou mais membros de um grupo relativamente pequeno de motivos estruturais característicos e reconhecíveis.

Para se ligarem especificamente a sequências de DNA, as proteínas regulatórias devem reconhecer características da superfície do DNA. A maioria dos grupos químicos que diferem entre as quatro bases e, portanto, permitem a distinção entre pares de bases, consiste em grupos doadores e aceptores de ligações de hidrogênio expostos no sulco maior do DNA (**Figura 28-9**), e a maior parte dos contatos proteína-DNA que conferem especificidade consiste em ligações de hidrogênio. Uma exceção notável é a superfície não polar próxima do C-5 de pirimidinas, onde a timina é prontamente distinguida da citosina pelo seu grupo metil protuberante. Os contatos proteína-DNA também são possíveis no sulco menor do DNA, mas os padrões de ligações de hidrogênio aqui geralmente não permitem uma pronta distinção entre os pares de bases.

No interior de proteínas regulatórias, as cadeias laterais de aminoácidos com ligações de hidrogênio mais frequentes com as bases no DNA são aquelas de resíduos de Asn, Gln, Glu, Lys e Arg. Haverá um código de reconhecimento simples em que um aminoácido particular sempre pareie com uma base específica? As duas ligações de hidrogênio que podem se formar entre Gln ou Asn e as posições $N^6$ e N-7 da adenina não podem se formar com qualquer outra base. E um resíduo de Arg pode formar duas ligações de hidrogênio com N-7 e $O^6$ da guanina (**Figura 28-10**). O exame da estrutura de muitas proteínas de ligação do DNA, entretanto, mostrou que uma proteína pode reconhecer cada par de bases em mais de uma maneira, levando à conclusão de que não há um código de aminoácidos simples. Em algumas proteínas, a interação Gln-adenina especifica pares de bases A═T, mas em outras uma bolsa de van der Waals para o

Glutamina (ou asparagina) — Timina═Adenina; Arginina — Citosina≡Guanina

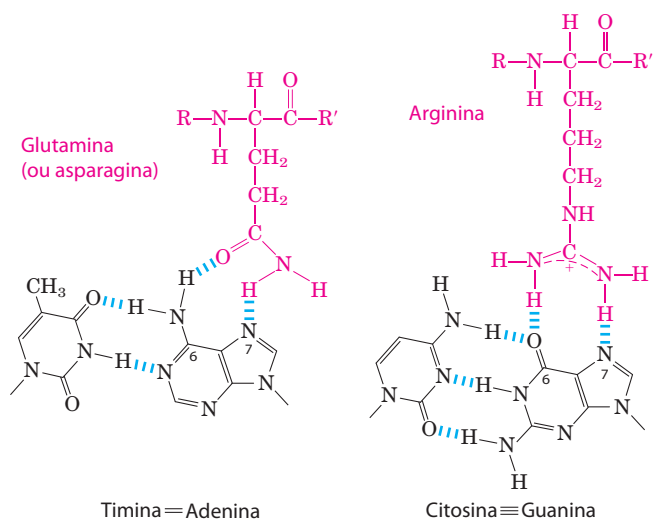



**FIGURA 28-10 Interações específicas entre resíduos de aminoácidos e pares de bases.** Os dois exemplos mostrados foram observados na ligação proteína-DNA.

grupo metila da timina reconhece pares de bases A═T. Os pesquisadores ainda não conseguem examinar a estrutura de uma proteína de ligação do DNA e inferir a sequência de DNA à qual ela se liga.

A fim de interagir com as bases no sulco maior do DNA, uma proteína precisa de uma subestrutura relativamente pequena que possa protrair de modo estável a partir da superfície da proteína. Os domínios de ligação de DNA das proteínas regulatórias tendem a ser pequenos (60 a 90 resíduos de aminoácidos), e ainda menores os motivos estruturais no interior desses domínios que estão na verdade em contato com o DNA. Muitas proteínas pequenas são instáveis devido à sua capacidade limitada de formar camadas de estrutura para ocultar os grupos hidrofóbicos (p. 116). Os motivos de ligação do DNA fornecem ou uma estrutura estável muito compacta ou uma maneira de permitir que um segmento de proteína se projete a partir da superfície da proteína.

Os sítios de ligação do DNA para proteínas regulatórias são frequentemente repetições invertidas de uma pequena sequência de DNA (palíndromo) em que múltiplas (geralmente duas) subunidades de uma proteína regulatória se ligam cooperativamente. O repressor Lac é incomum pelo fato de funcionar como tetrâmero, com dois dímeros unidos presos na extremidade distante dos sítios de ligação do DNA (Figura 28-8b). Uma célula de *E. coli* geralmente contém cerca de 20 tetrâmeros do repressor Lac. Cada um dos dímeros unidos se liga separadamente a uma sequência operadora palindrômica, em contato com 17 pb de uma região com 22 pb no óperon *lac*. E cada um dos dímeros unidos pode se ligar independentemente a uma sequência operadora, com um geralmente se ligando a $O_1$ e o outro a $O_2$ ou $O_3$ (como na Figura 28-8b). A simetria da sequência operadora $O_1$ corresponde ao eixo duplo de simetria das duas subunidades repressoras do Lac pareadas. O repressor tetramérico do Lac se liga às sequências do seu operador *in vivo* com uma constante de dissociação estimada em cerca de $10^{-10}$ M. O repressor diferencia os operadores de outras sequências com uma diferença de cerca de $10^6$, de modo que a ligação a esses poucos pares de bases entre os cerca de 4,6 milhões do cromossomo de *E. coli* é altamente específica.

Vários motivos de ligação do DNA foram descritos, mas aqui serão focalizados dois que desempenham papéis de destaque na ligação do DNA por proteínas regulatórias: a **hélice-volta-hélice** e o **dedo de zinco**. Também será abordado um tipo de domínio de ligação do DNA – o homeodomínio – encontrado em algumas proteínas de eucariotos.

**Hélice-volta-hélice** Esse motivo de ligação do DNA é crucial para a interação de muitas proteínas regulatórias bacterianas com o DNA, e motivos semelhantes ocorrem em algumas proteínas regulatórias de eucariotos. O motivo hélice-volta-hélice compreende cerca de 20 aminoácidos em dois segmentos curtos $\alpha$ helicoidais, cada um com sete a nove resíduos de aminoácidos de comprimento, separados por uma volta $\beta$ (**Figura 28-11**). Essa estrutura geralmente não é estável por si só; ela é simplesmente a porção reativa de um domínio de ligação do DNA um pouco maior. Um dos dois segmentos helicoidais é chamado de hélice de reconhecimento, pois geralmente contém muitos dos aminoácidos que interagem com o DNA de um modo específico da sequência. Essa hélice $\alpha$ é empilhada em outros segmentos da estrutura proteica de modo a se projetar a partir da superfície da proteína. Quando ligada ao DNA, a hélice de reconhecimento é posicionada no sulco principal ou próxima a ele. O repressor Lac apresenta seu motivo de ligação do DNA (Figura 28-11).

**FIGURA 28-11 Hélice-volta-hélice.** (PDB ID 2PE5) **(a)** Domínio de ligação de DNA do repressor Lac ligado ao DNA (azul e cor de laranja). O motivo hélice-volta-hélice é mostrado em azul-escuro e roxo; a hélice de reconhecimento do DNA é roxa. **(b)** Repressor Lac inteiro. Os domínios de ligação de DNA estão em azul-claro, e as hélices $\alpha$ envolvidas na formação do tetrâmero estão em verde. O restante da proteína (tons de vermelho) tem os sítios de ligação para a alolactose. Os domínios de ligação da alolactose estão ligados aos domínios de ligação de DNA por meio de hélices ligadoras (amarelo).

**Dedo de zinco** Em um dedo de zinco, cerca de 30 resíduos de aminoácidos formam uma alça alongada unida na base por um único íon $Zn^{2+}$, coordenado a quatro dos resíduos (quatro Cys, ou dois Cys e dois His). Por si só, o zinco não interage com o DNA; em vez disso, a coordenação do zinco com os resíduos de aminoácidos estabiliza esse pequeno motivo estrutural. Várias cadeias laterais hidrofóbicas no núcleo da estrutura também fornecem estabilidade. A **Figura 28-12** mostra a interação entre o DNA e três dedos de zinco de um único polipeptídeo da proteína regulatória do camundongo Zif268.

Muitas proteínas de ligação de DNA de eucariotos contêm dedos de zinco. Em geral, a interação de um único dedo de zinco com o DNA é fraca, e muitas proteínas de ligação do DNA, como a Zif268, apresentam múltiplos dedos de zinco que estimulam substancialmente a ligação ao interagir simultaneamente com o DNA. Uma proteína de

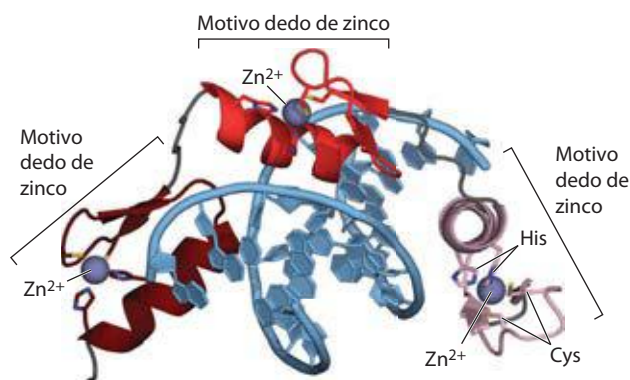



**FIGURA 28-12 Dedos de zinco.** (PDB ID 1ZAA) Três dedos de zinco (tons de vermelho) da proteína regulatória Zif268, complexada com o DNA (azul). Cada $Zn^{2+}$ coordena com duas His e dois resíduos de Cys.

**FIGURA 28-13 Homeodomínios.** (PDB ID 1FJL) São mostrados aqui dois homeodomínios ligados ao DNA. Em cada homeodomínio, uma das $\alpha$ hélices (roxo), depositada em duas outras (azul-escuro e cinza), pode ser vista protraindo para o sulco maior. Isso é apenas uma pequena parte de uma proteína regulatória maior de uma classe chamada Pax, ativa na regulação do desenvolvimento em moscas-da-fruta (ver Seção 28.3).

ligação do DNA da rã *Xenopus* tem 37 dedos de zinco. Há poucos exemplos conhecidos do motivo dedo de zinco em proteínas bacterianas.

O modo preciso pelo qual proteínas com dedos de zinco se ligam ao DNA difere de uma proteína para outra. Alguns dedos de zinco contêm resíduos de aminoácidos importantes na diferenciação de sequências, enquanto outros parecem se ligar ao DNA de modo não específico (os aminoácidos necessários para a especificidade estão localizados em outra parte da proteína). Os dedos de zinco também funcionam como motivos de ligação do DNA – por exemplo, em certas proteínas que ligam o mRNA de eucariotos e atuam como repressores da tradução. Esse papel será discutido posteriormente (Seção 28.3).

**Homeodomínio** Outro tipo de domínio de ligação do DNA foi identificado em algumas proteínas que funcionam como reguladores de transcrição, especialmente durante o desenvolvimento de eucariotos. Esse domínio de aminoácidos – chamado de **homeodomínio** porque foi descoberto em genes homeóticos (genes que regulam o desenvolvimento de padrões corporais) – é altamente conservado e foi agora identificado em proteínas de uma grande variedade de organismos, incluindo humanos (**Figura 28-13**). O segmento de ligação de DNA do **domínio** está relacionado ao motivo hélice-volta-hélice. A sequência de DNA que codifica esse domínio é conhecida como **homeobox**.

## Proteínas regulatórias também têm domínios de interação proteína-proteína

Proteínas regulatórias contêm domínios não apenas para a ligação do DNA, mas também para interações proteína-proteína – com a RNA-polimerase, outras proteínas regulatórias ou outras subunidades da mesma proteína regulatória. Exemplos incluem muitos fatores de transcrição de eucariotos que funcionam como ativadores de genes, frequentemente ligado como dímeros ao DNA, pelos domínios de ligação do DNA que contêm dedos de zinco. Alguns domínios estruturais são dedicados às interações necessárias à formação de dímeros, geralmente um pré-requisito para a ligação do DNA. Como os motivos de ligação do DNA, os motivos estruturais que controlam as interações proteína-proteína tendem a pertencer a algumas categorias comuns. Dois exemplos importantes são o **zíper de leucina** e **hélice-alça-hélice básica**. Motivos estruturais como esses são a base para classificar algumas proteínas regulatórias em famílias estruturais.

**Zíper de leucina** Esse motivo é uma hélice $\alpha$ anfipática com uma série de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos concentrados de um lado (**Figura 28-14**), com a superfície hidrofóbica formando a área de contato entre os dois polipeptídeos de um dímero. Uma característica marcante dessas hélices $\alpha$ é a ocorrência de resíduos Leu a cada sétima posição, formando uma linha reta ao longo da superfície hidrofóbica. Embora os pesquisadores inicialmente pensassem que os resíduos de leucina interdigitavam (daí o nome "zíper"), agora se sabe que eles se alinham lado a lado à medida que as hélices $\alpha$ que interagem se enrolam uma em torno da outra (formando uma espiral espiralada; Figura 28-14b). Proteínas regulatórias com zíperes de leucina frequentemente têm um domínio de ligação de DNA separado com alta concentração de resíduos básicos (Lys ou Arg) que podem interagir com os fosfatos carregados negativamente do esqueleto do DNA. Os zíperes de leucina foram encontrados em muitas proteínas de eucariotos e em algumas proteínas bacterianas.

**Hélice-alça-hélice básica** Outro motivo estrutural comum ocorre em algumas proteínas regulatórias de eucariotos implicadas no controle da expressão gênica durante o desenvolvimento de organismos pluricelulares. Essas proteínas compartilham uma região conservada de cerca de 50 resíduos de aminoácidos, importante tanto na ligação de DNA quanto na dimerização de proteínas. Essa região forma duas $\alpha$ hélices anfipáticas ligadas por uma alça de comprimento variável, a hélice-alça-hélice (distinta do motivo

**(a)**

| Fonte | Proteína regulatória | Sequência de aminoácidos: Região de ligação do DNA | Conector (6 aminoácidos) | Zíper de leucina |
|---|---|---|---|---|
| Mamíferos | C/EBP | D K N S N E Y R V R R E R N N I A V R K S R D K A | K Q R N V E | T Q Q K V L E L T S D N D R L R K R V E Q L S R E L D T L R G – |
| | Jun | S Q E R I K A E R K R M R N R I A A S K C R K R K | L E R I A R | L E E K V K T L K A Q N S E L A S T A N M L T E Q V A Q L K Q – |
| | Fos | E E R R R I R R I R R E R N K M A A A K C R N R R | R E L T D T | L Q A E T D Q L E D K K S A L Q T E I A N L L K E K E K L E F – |
| Leveduras | GCN4 | P E S S D P A A L K R A R N T E A A R R S R A R K | L Q R M K Q | L E D K V E E L L S K N Y H L E N E V A R L K K L V G E R |
| Sequências de consenso | | - - - - - - - - - R/K R/K - R/K N - - - - - R/K - R - R/K R/K | - - - - - - | L - - - - - - L - - - - - - L - - - - - - L - - - - - - L |

Asn invariável

**(b)**

Região de zíper

Região de ligação de DNA

**FIGURA 28-14 Zíperes de leucina. (a)** Comparação de sequências de aminoácidos de várias proteínas zíper de leucina. Observe os resíduos de Leu (L) (vermelho) a cada sétima posição na região do zíper, e o número de resíduos de Lys (K) e Arg (R) na região de ligação do DNA (amarelo). **(b)** (PDB ID 1YSA) Zíper de leucina da proteína GCN4 ativadora de leveduras. Apenas as hélices "*zippered*" (cinza), derivadas de diferentes subunidades da proteína dimérica, são mostradas. As duas hélices se enrolam uma em torno da outra em uma espiral suave. As cadeias laterais de Leu e os resíduos conservados na região de ligação de DNA são coloridos para corresponderem à sequência em (a).

hélice-volta-hélice associado à ligação do DNA). Os motivos hélice-alça-hélice de dois polipeptídeos interagem para formar dímeros (**Figura 28-15**). Nessas proteínas, a ligação do DNA é mediada por uma sequência adjacente curta de aminoácidos rica em resíduos básicos, semelhante à região de ligação de DNA separada nas proteínas que contêm zíperes de leucina.

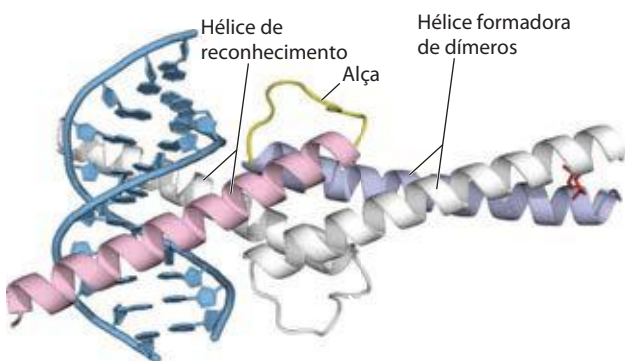



**FIGURA 28-15 Hélice-alça-hélice.** (PDB ID 1HLO) O fator de transcrição humano Max, ligado ao seu sítio-alvo no DNA. A proteína é dimérica; uma subunidade é colorida. A hélice de reconhecimento (cor-de-rosa) é ligada pela alça à hélice formadora de dímeros (azul-claro), que se funde à extremidade carboxila terminal da subunidade. A interação das hélices da carboxila terminal das duas subunidades apresenta uma espiral muito semelhante àquela de um zíper de leucina (ver Figura 28-14b), mas com apenas um par de resíduos de Leu que interagem (cadeias laterais vermelhas à direita) nesse exemplo. A estrutura geral é algumas vezes chamada de hélice-alça-hélice/motivo de zíper de leucina.

**Interações proteína-proteína em proteínas regulatórias de eucariotos** Em eucariotos, a maioria dos genes é regulada por ativadores, e a maioria deles é monocistrônica. Se um ativador diferente fosse necessário para cada gene, o número de ativadores (e de genes que os codificam) teria de ser equivalente ao número de genes regulados. Entretanto, em leveduras, cerca de 300 fatores de transcrição (muitos deles ativadores) são responsáveis pela regulação de muitos milhares de genes de leveduras. Muitos dos fatores de transcrição regulam a indução de genes múltiplos, mas a maioria dos genes está sujeita à regulação por múltiplos fatores de transcrição. A regulação apropriada de diferentes genes é feita utilizando diferentes combinações de um repertório limitado de fatores de transcrição em cada gene, fenômeno chamado de **controle combinatorial**.

O controle combinatório é realizado em parte misturando-se e combinando as variantes no interior da família de proteínas reguladoras para formar uma série de diferentes dímeros de proteínas ativas. Várias famílias de fatores de transcrição de eucariotos foram definidas com base em semelhanças estruturais estreitas. Dentro de cada família, dímeros podem às vezes se formar entre duas proteínas idênticas (homodímero) ou entre dois membros diferentes da família (heterodímero). Portanto, uma família hipotética de quatro proteínas zíper de leucina diferentes forma até 10 espécies diméricas diferentes. Em muitos casos, as diferentes combinações têm propriedades funcionais e regulatórias distintas e funcionam na regulação de diferentes genes. Como será visto, as proteínas regulatórias múltiplas desse tipo funcionam na regulação da maioria dos genes de eucariotos, contribuindo adicionalmente para o controle combinatorial.

Além de ter domínios estruturais destinados à ligação de DNA e dimerização, que direciona um dímero proteico em particular a um gene específico, muitas proteínas regulatórias têm domínios que interagem com a RNA-polimerase, com proteínas regulatórias não relacionadas, ou com ambas. Pelo menos três tipos de domínios adicionais para interação proteína-proteína foram caracterizados (principalmente em eucariotos): domínios ricos em glutamina, domínios ricos em prolina e domínios ácidos, os nomes refletindo os resíduos de aminoácidos especialmente abundantes.

Interações de ligações proteína-DNA são a base dos intricados circuitos regulatórios fundamentais ao funcionamento dos genes. Agora será realizado um exame mais detalhado dos esquemas regulatórios desses genes, primeiro em bactérias e depois em sistemas eucarióticos.

### RESUMO 28.1 Princípios da regulação gênica

- A expressão dos genes é regulada por processos que afetam as taxas em que os produtos gênicos são sintetizados e degradados. A maior parte dessa regulação ocorre no nível da iniciação da transcrição, mediada por proteínas regulatórias que ou reprimem a transcrição (regulação negativa) ou ativam a transcrição (regulação positiva) em promotores específicos.
- Em bactérias, os genes que codificam produtos com funções interdependentes são frequentemente agrupados em um óperon, unidade única de transcrição. A transcrição dos genes geralmente é bloqueada pela ligação de uma proteína repressora específica em um sítio de DNA chamado de operador. A dissociação do repressor do operador é mediada por uma molécula específica pequena, um indutor. Esses princípios foram primeiro elucidados em estudos do óperon da lactose (*lac*). O repressor Lac se dissocia do operador *lac* quando o repressor se liga ao seu indutor, a alolactose.
- As proteínas regulatórias são proteínas de regulação do DNA que reconhecem sequências de DNA específicas; a maioria tem domínios de ligação do DNA distintos. No interior desses domínios, os motivos estruturais comuns que se ligam ao DNA são a hélice-volta-hélice, o dedo de zinco e o homeodomínio.
- Proteínas regulatórias também contêm domínios para interações proteína-proteína, incluindo o zíper de leucina e a hélice-alça-hélice, que estão envolvidos na dimerização, e outros motivos envolvidos na ativação da transcrição. A mistura e a combinação de variantes de famílias de proteínas em fatores de transcrição diméricos fornecem uma regulação de resposta mais eficiente por meio do controle combinatório.

## 28.2 Regulação da expressão gênica em bactérias

Como em muitas outras áreas de investigação bioquímica, o estudo da regulação da expressão gênica avançou mais cedo e mais rápido em bactérias do que em outros organismos experimentais. Os exemplos de regulação gênica bacteriana aqui apresentados são escolhidos entre os valores de sistemas bem estudados, parcialmente devido ao seu significado histórico, mas principalmente porque fornecem uma boa visão geral da amplitude de mecanismos regulatórios em bactérias. Muitos dos princípios da regulação gênica bacteriana também são relevantes para compreender a expressão gênica em células eucarióticas.

Primeiramente, serão examinados os óperons da lactose e triptofano; cada sistema apresenta proteínas regulatórias, mas os mecanismos gerais de regulação são muito diferentes. Depois será feita uma pequena discussão da resposta SOS em *E. coli*, ilustrando como genes espalhados por todo o genoma podem ser regulados coordenadamente. Então serão descritos dois sistemas bacterianos de tipos muito diferentes, ilustrando a diversidade dos mecanismos regulatórios dos genes: a regulação da síntese proteica ribossomal no nível da tradução, com muitas das proteínas regulatórias se ligando ao RNA (em vez de ao DNA), e a regulação do processo de "variação de fase" em *Salmonella*, que resulta da recombinação gênica. Finalmente, serão examinados alguns exemplos adicionais de regulação pós-transcricional em que o RNA modula sua própria função.

### O óperon *lac* sofre regulação positiva

As interações operador-repressor-indutor descritas inicialmente para o óperon *lac* (Figura 28-8) fornecem um modelo intuitivamente satisfatório para um interruptor ligado/desligado na regulação da expressão gênica. Na verdade, a regulação do óperon é raramente tão simples. O ambiente de uma bactéria é complexo demais para que seus genes sejam controlados por um sinal. Outros fatores além da lactose afetam a expressão dos genes *lac*, tais como a disponibilidade de glicose. Esta, metabolizada diretamente pela glicólise, é a fonte de energia preferida em *E. coli*. Outros açúcares podem servir como único nutriente principal, mas etapas enzimáticas extras são necessárias para prepará-los para entrar na glicólise, precisando da síntese de enzimas adicionais. Claramente, expressar os genes para proteínas que metabolizam açúcares como lactose ou arabinose é um desperdício quando a glicose é abundante.

O que acontece à expressão do óperon *lac* quando tanto a glicose quanto a lactose estão presentes? Um mecanismo regulatório conhecido como **repressão de catabólitos** restringe a expressão dos genes necessários para o catabolismo de lactose, arabinose e outros açúcares na presença de glicose, mesmo quando esses açúcares secundários também estão presentes. O efeito da glicose é mediado pelo cAMP, como coativador, e uma proteína ativadora conhecida como **proteína receptora de cAMP**, ou **CRP** (a proteína às vezes é chamada de CAP, ou seja, proteína ativadora de genes para catabólitos). A CRP é um homodímero (subunidade $M_r$ 22.000) com sítios de ligação para o DNA e o cAMP. A ligação é mediada por um motivo hélice-volta-hélice no domínio de ligação de DNA da proteína (**Figura 28-16**). Quando a glicose está ausente, a CRP-cAMP se liga a um sítio próximo do promotor *lac* (**Figura 28-17**) e estimula a transcrição de RNA em 50

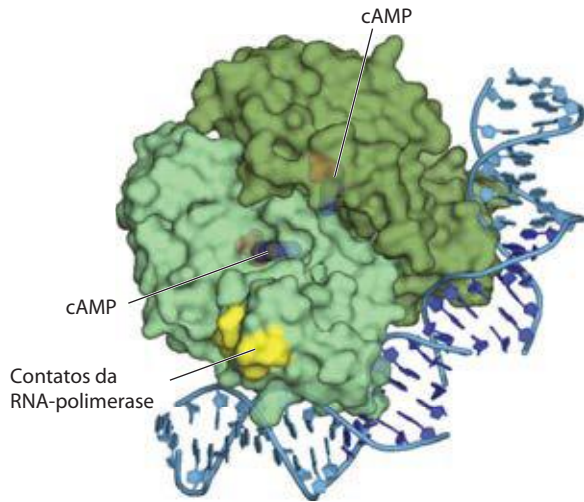
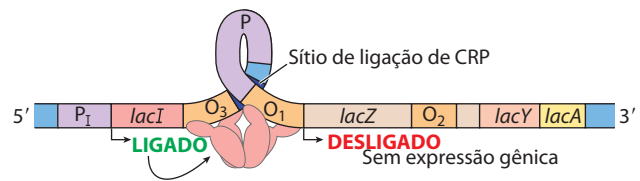
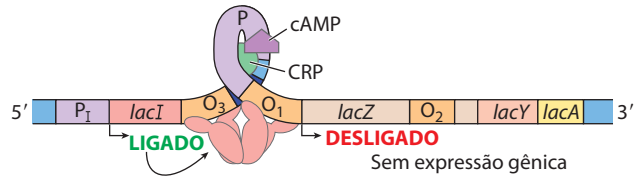
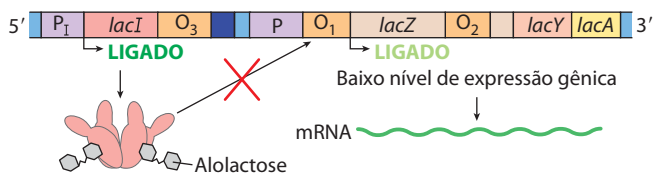



**FIGURA 28-16 Homodímero CRP com cAMP ligado.** (PDB ID 1RUN) Observe o enovelamento do DNA em volta da proteína. A região que interage com a DNA-polimerase é indicada.

vezes. A CRP-cAMP é, portanto, um elemento regulatório positivo que responde aos níveis de glicose, enquanto o repressor Lac é um elemento regulatório negativo que responde à lactose. Os dois atuam em conjunto. A CRP--cAMP tem pouco efeito no óperon *lac* quando o repressor Lac está bloqueando a transcrição, e a dissociação do repressor do operador *lac,* tem pouco efeito na transcrição do óperon *lac*, a menos que o CRP-cAMP esteja presente para facilitar a transcrição; quando a CRP não está ligado, o promotor do *lac* do tipo selvagem é um promotor relativamente fraco (Figura 28-17a, c). O complexo aberto de RNA-polimerase e promotor (ver Figura 26-6) não se forma prontamente, a menos que a CRP-cAMP esteja presente. A CRP interage diretamente com a RNA-polimerase (na região mostrada na Figura 28-16) por meio da subunidade $\alpha$ da polimerase.

O efeito da glicose na CRP é mediado pela interação com a cAMP (Figura 28-17). A CRP se liga ao DNA mais avidamente quando as concentrações de cAMP estão altas. Na presença de glicose, a síntese de cAMP é inibida e o efluxo de cAMP da célula é estimulado. À medida que ela declina [a cAMP], a CRP a ligação ao DNA diminui, reduzindo a expressão do óperon *lac*. Portanto, forte indução do óperon *lac* precisa tanto de lactose (para inativar o repressor *lac*) quanto de baixa concentração de glicose (para disparar um aumento na cAMP e maior ligação de cAMP à CRP).

A CRP e a cAMP estão envolvidas na regulação coordenada de muitos óperons, principalmente daqueles que codificam enzimas para o metabolismo de açúcares secundários como a lactose e arabinose. Uma rede de óperons com um regulador comum é chamada de **regulon**. Esse arranjo, que permite mudanças coordenadas nas funções celulares que precisam da ação de centenas de genes, é um tema central na expressão regulada de redes dispersas de genes em eucariotos. Outros regulons bacterianos incluem o sistema de genes de choque térmico que responde a mudanças de temperatura (p. 1061) e os genes induzidos em *E. coli* como parte do sistema de resposta SOS ao dano do DNA, descrito posteriormente.

**(a) Glicose alta, cAMP baixo, lactose ausente**

**(b) Glicose baixa, cAMP alto, lactose ausente**

**(c) Glicose alta, cAMP baixo, lactose presente**

**(d) Glicose baixa, cAMP alto, lactose presente**

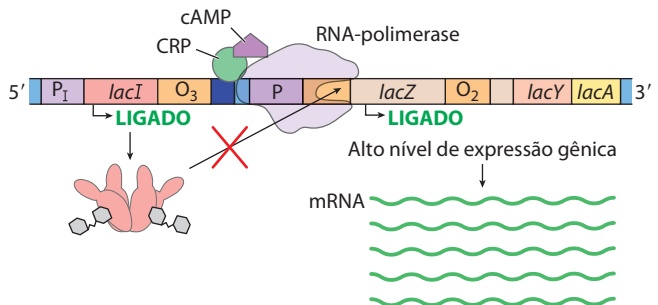



**FIGURA 28-17 Regulação positiva do óperon *lac* por CRP.** O sítio de ligação para a CRP-cAMP está próximo do promotor. São mostrados os efeitos combinados da disponibilidade de glicose e lactose na expressão do óperon *lac*. Quando a lactose está ausente, o repressor se liga ao operador e impede a transcrição dos genes *lac*. Não importa se a glicose está **(a)** presente ou **(b)** ausente. **(c)** Se a lactose estiver presente, o repressor se dissocia do operador. Entretanto, se a glicose também estiver disponível, os baixos níveis de cAMP impedem a formação de CRP-cAMP e a ligação de DNA. A RNA-polimerase pode ocasionalmente se ligar e iniciar a transcrição, resultando em um nível muito baixo de transcrição do gene *lac*. **(d)** Quando a lactose está presente e os níveis de glicose estão baixos, os níveis de cAMP aumentam. O complexo CRP-cAMP se forma e facilita a ligação robusta da RNA-polimerase ao promotor *lac* e altos níveis de transcrição.

**FIGURA 28-18 O óperon *trp*.** Esse óperon é regulado por dois mecanismos: quando os níveis de triptofano são altos, (1) o repressor (superior esquerdo) se liga ao seu operador e (2) a transcrição do mRNA *trp* é atenuada (ver Figura 28-19). A biossíntese do triptofano pelas enzimas codificadas no óperon *trp* está diagramada na parte inferior (ver também Figura 22-19).

## Muitos genes para as enzimas da biossíntese de aminoácidos são regulados pela atenuação da transcrição

Os 20 aminoácidos mais comuns são necessários em grandes quantidades para a síntese proteica, e a *E. coli* pode sintetizar todos eles. Os genes para as enzimas necessárias para sintetizar um determinado aminoácido estão geralmente agrupados em um óperon e são expressos sempre que as reservas existentes de aminoácidos sejam inadequadas para as necessidades celulares. Quando os aminoácidos são abundantes, as enzimas de biossíntese não são necessárias e o óperon é reprimido.

O óperon do triptofano (*trp*) de *E. coli* (**Figura 28-18**) inclui cinco genes para as enzimas necessárias para converter corismato em triptofano. Observe que duas das enzimas catalisam mais de uma etapa na via. O mRNA do óperon *trp* tem meia-vida de apenas cerca de 3 minutos, permitindo que a célula responda rapidamente às variações de necessidade desse aminoácido. O repressor Trp é um homodímero. Quando o triptofano é abundante, ele se liga ao repressor de Trp, provocando uma mudança conformacional que permite ao repressor se ligar ao operador *trp* e inibir a expressão do óperon *trp*. O sítio do operador *trp* se sobrepõe ao promotor, de modo que a ligação do repressor bloqueia a ligação da RNA-polimerase.

Uma vez mais, esse circuito liga/desliga simples mediado por um repressor não conta toda a história regulatória. Concentrações celulares diferentes de triptofano podem variar a velocidade de síntese das enzimas de biossíntese em uma faixa de 700 vezes. Uma vez que a repressão seja suspensa e a transcrição se inicie, a velocidade de transcrição é ajustada às necessidades celulares de triptofano por um segundo processo regulatório, chamado de **atenuação da transcrição**, em que a transcrição é iniciada normalmente, mas é abruptamente interrompida *antes* que os genes do óperon sejam transcritos. A frequência com que a transcrição é atenuada é regulada pela disponibilidade de triptofano e depende da associação muito estreita entre transcrição e tradução em bactérias.

O mecanismo de atenuação do óperon *trp* emprega sinais codificados em quatro sequências no interior de uma região **líder** de 162 nucleotídeos na extremidade 5′ do mRNA, antecedendo o códon de iniciação do primeiro gene (**Figura 28-19a**). No interior do líder se encontra uma região conhecida como **atenuadora**, composta pelas sequências 3 e 4. Essas sequências pareiam para formar uma estrutura em grampo rica em G≡C seguida de perto por uma série de resíduos de U. A estrutura atenuadora atua como terminador da transcrição (Figura 28-19b). A sequência 2 é um complemento alternativo à sequência 3 (Figura 28-19c). Se as sequências 2 e 3 pareiam, a estrutura atenuadora não pode se formar e a transcrição continua para os genes da biossíntese de *trp*; a alça formada pelas sequências pareadoras 2 e 3 não obstruem a transcrição.

**(a)**

Quando os níveis de triptofano estão altos, o ribossomo rapidamente traduz a sequência 1 (fase de leitura aberta codificando o peptídeo líder) e bloqueia a sequência 2 antes da sequência 3 ser transcrita. A transcrição contínua leva à atenuação na estrutura atenuadora semelhante a um terminador formada pela sequências 3 e 4.

Quando os níveis de triptofano estão baixos, o ribossomo pausa nos códons Trp na sequência 1. A formação da estrutura pareada entre as sequências 2 e 3 impede a atenuação, pois a sequência 3 não está mais disponível para formar a estrutura do atenuador com a sequência 4. A estrutura 2:3, ao contrário do atenuador 3:4, não impede a transcrição.

**(b)**

**(c)**

**FIGURA 28-19 Atenuação da transcrição no óperon *trp*.** A transcrição é iniciada no começo do mRNA líder de 162 nucleotídeos codificado por uma região do DNA chamada *trpL* (ver Figura 28-18). Um mecanismo regulatório determina se a transcrição é atenuada no final do líder ou continua para os genes estruturais. **(a)** O mRNA *trp* líder (*trpL*). O mecanismo de atenuação do óperon *trp* envolve as sequências 1 a 4 (destacado). **(b)** A sequência 1 codifica um pequeno peptídeo, o peptídeo líder, contendo dois resíduos Trp (W); ele é traduzido imediatamente após o início da transcrição. As sequências 2 e 3 são complementares, bem como as sequências 3 e 4. A estrutura do atenuador se forma pelo pareamento das sequências 3 e 4 (acima). Sua estrutura e função são similares àquelas de um terminador de transcrição (ver Figura 26-7a). O pareamento das sequências 2 e 3 (embaixo) impede a formação da estrutura do atenuador. Observe que o peptídeo líder não tem outra função celular. A tradução da sua fase de leitura aberta tem um papel puramente regulatório que determina que sequências complementares (2 e 3 ou 3 e 4) são pareadas. **(c)** Esquemas de pareamento de bases para as regiões complementares do mRNA *trp* líder.

A sequência regulatória 1 é crucial para um mecanismo sensível ao triptofano que determina se a sequência 3 pareia com a sequência 2 (permitindo que a transcrição continue) ou com a sequência 4 (atenuando a transcrição). A formação da estrutura atenuadora em grampo depende de eventos que ocorrem durante a *tradução* da sequência regulatória 1, que codifica um peptídeo líder (assim chamado porque ele é codificado pela região líder do mRNA) de 14 aminoácidos, dois dos quais são resíduos de Trp. O peptídeo líder não tem nenhuma outra função celular conhecida; sua síntese é simplesmente um dispositivo regulatório do óperon. Esse peptídeo é traduzido imediatamente depois que ele é transcrito, por um ribossomo que acompanha de perto a RNA-polimerase à medida que a transcrição prossegue.

Quando as concentrações de triptofano são altas, as concentrações de tRNA de triptofano com carga também são altas. Isso permite que a tradução prossiga rapidamente após os dois códons Trp da sequência 1 e para a sequência 2, antes da sequência 3 ser sintetizada pela RNA-polimerase. Nessa situação, a sequência 2 é coberta pelo ribossomo e indisponível para pareamento com a sequência 3 quando a mesma é sintetizada; a estrutura atenuadora (sequência 3 e 4) se forma e a transcrição é interrompida (Figura 28-19b, acima). Quando as concentrações de triptofano são baixas, no entanto, o ribossomo para nos dois códons Trp na sequência 1, pois o $tRNA^{Trp}$ com carga está menos disponível. A sequência 2 permanece livre enquanto a sequência 3 é sintetizada, permitindo que essas duas sequências pareiem e que a transcrição prossiga (Figura 28-19b, embaixo). Desse modo, a proporção de transcritos que é atenuada diminui à medida que a concentração de triptofano diminui.

Muitos outros óperons biossintéticos de aminoácidos usam uma estratégia de atenuação similar para ajustar as enzimas biossintéticas para atender as necessidades celulares predominantes. O peptídeo líder de 15 aminoácidos produzido pelo óperon *phe* contém sete resíduos Phe. O peptídeo líder do óperon *leu* tem quatro resíduos contíguos Leu. O peptídeo líder para o óperon *his* contém sete resíduos contíguos His. De fato, no óperon *his* e em vários outros, a atenuação é suficientemente sensível para ser o *único* mecanismo regulatório.

## A indução da resposta SOS requer a destruição das proteínas repressoras

Dano extenso ao DNA no cromossomo bacteriano dispara a indução de muitos genes localizados a distância. Essa resposta, chamada de resposta SOS (p. 1035), fornece outro bom exemplo de regulação gênica coordenada. Muitos dos genes induzidos estão envolvidos no reparo do DNA (ver Tabela 25-6). As proteínas regulatórias chave são a proteína RecA e o repressor LexA.

O repressor LexA($M_r$ 22.700) inibe a transcrição de todos os genes SOS (**Figura 28-20**), e a redução da resposta SOS requer a remoção de LexA. Isso não é uma simples dissociação do DNA em resposta à ligação de uma pequena molécula, como na regulação do óperon *lac* descrita acima. Em vez disso, o repressor LexA é inativado quando ele catalisa sua própria clivagem em uma ligação peptídica específica Ala-Gly, produzindo dois fragmentos proteicos aproximadamente iguais. No pH fisiológico, essa reação de autoclivagem precisa da proteína RecA. Ela não é uma protease no sentido clássico, mas uma interação com LexA

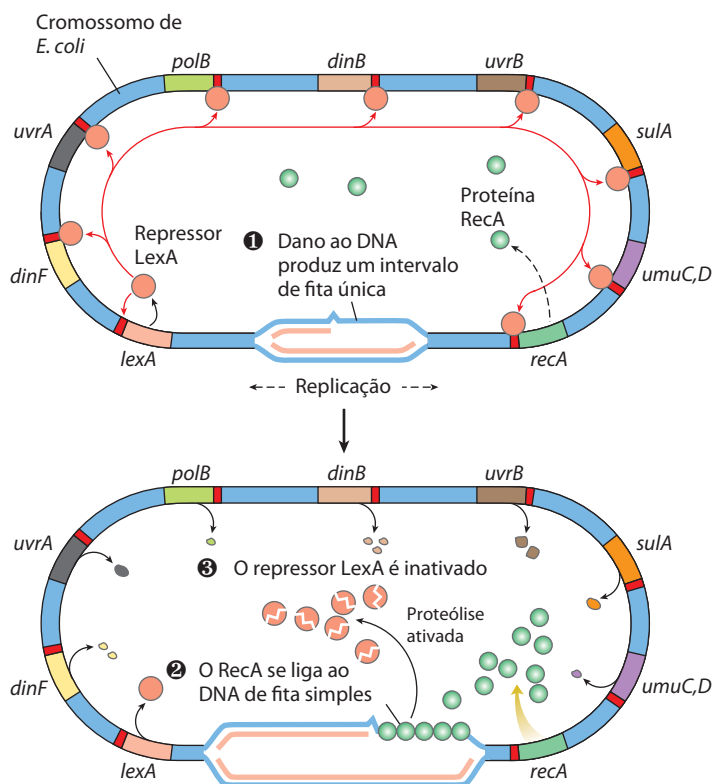



**FIGURA 28-20 Resposta SOS em *E. coli*.** Ver na Tabela 25-6 as funções de muitas destas proteínas. A proteína LexA é o repressor nesse sistema, que tem um sítio operador (vermelho) perto de cada gene. Como o gene *recA* não é inteiramente reprimido pelo repressor LexA, a célula normal contém cerca de 1.000 monômeros RecA. ❶ Quando o DNA é extensamente danificado (como pela luz UV), a replicação do DNA é suspensa e aumenta o número de intervalos de fita simples no DNA. ❷ A proteína RecA se liga a esse DNA danificado de fita simples, ativando a atividade de coprotease da proteína. ❸ Enquanto está ligada ao DNA, a proteína RecA facilita a quebra e inativação do repressor LexA. Quando o repressor é inativado, os genes SOS, inclusive *recA*, são induzidos; os níveis de RecA aumentam 50 a 100 vezes.

facilita a reação de autoclivagem do repressor. Essa função da RecA é às vezes chamada de atividade de coprotease.

A protease RecA fornece a ligação funcional entre o sinal biológico (dano do DNA) e indução dos genes SOS. Danos intensos do DNA levam a numerosos intervalos em uma das fitas do DNA, e apenas a RecA que está ligada ao DNA de fita única pode facilitar a clivagem do repressor de LexA (Figura 28-20, embaixo). Por fim, a ligação de RecA nos intervalos ativa sua atividade de coprotease, levando à clivagem do repressor de LexA e à indução SOS. Durante a indução da resposta SOS em uma célula danificada gravemente, a RecA também quebra e, portanto, inativa os repressores que, caso contrário, permitem a propagação de certos vírus em um estado lisogênico dormente no interior do hospedeiro bacteriano. Isso fornece uma ilustração excepcional da adaptação evolutiva. Esses repressores, como o LexA, também sofrem autoclivagem em uma ligação peptídica específica Ala–Gly, de modo que a indução da resposta SOS permita a replicação do vírus e a lise da célula, liberando novas partículas de vírus. Portanto, o bacteriófago pode fazer uma saída rápida de uma célula bacteriana hospedeira comprometida.

## A síntese de proteínas ribossomais é coordenada com a síntese de rRNA

Em bactérias, uma crescente demanda celular por síntese proteica é contemplada pelo aumento do número de ribossomos em vez de alterações na atividade de ribossomos individuais. Em geral, o número de ribossomos aumenta à medida que a velocidade de crescimento celular aumenta. Em velocidades de crescimento mais altas, os ribossomos representam 45% do peso seco da célula. A proporção de recursos celulares destinados a fabricar os ribossomos é tão grande, e a função dos ribossomos tão importante, que as células devem coordenar a síntese dos componentes ribossomais: as proteínas ribossomais (r-proteínas) e RNA (rRNA). Essa regulação é distinta dos mecanismos descritos até agora, uma vez que ela ocorre em grande parte no nível da *tradução*.

Os 52 genes que codificam as r-proteínas ocorrem em pelo menos 20 óperons, cada um com 1 a 11 genes. Alguns desses óperons também contêm os genes para as subunidades da DNA-primase (ver Figura 25-12), RNA-polimerase (ver Figura 26-4) e para a síntese proteica de fatores de alongamento (ver Figura 27-29) – revelando a associação estreita entre replicação, transcrição e síntese proteica durante o crescimento celular.

Os óperons de r-proteínas são regulados principalmente por um mecanismo de *feedback* da tradução. Uma r-proteína codificada por cada óperon também funciona como um **repressor de tradução**, que se liga ao mRNA transcrito daquele óperon e bloqueia a tradução de todos os genes que o mensageiro codifica (**Figura 28-21**). Em geral, a r-proteína que desempenha o papel de repressora também se liga diretamente a um rRNA. Cada r-proteína repressora da tradução se liga com maior afinidade ao rRNA apropriado do que ao seu mRNA, de modo que o mRNA é ligado e a tradução reprimida apenas quando o nível da r-proteína

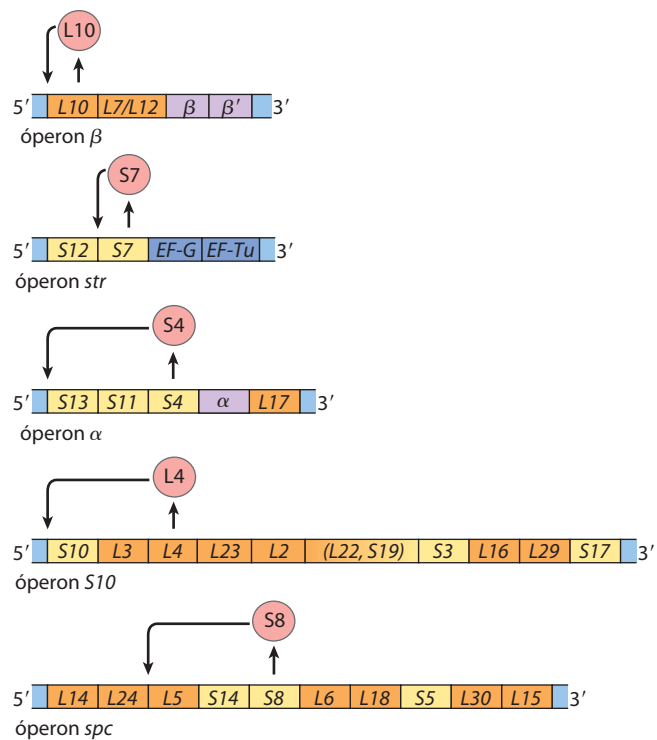
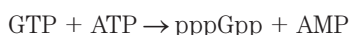



**FIGURA 28-21** ***Feedback* de tradução em alguns óperons de proteínas ribossomais.** As r-proteínas que atuam como repressores de tradução estão em cor salmão. Cada repressor de tradução bloqueia a tradução de todos os genes naquele óperon ao se ligar ao sítio indicador no mRNA. Os genes que codificam as subunidades de RNA-polimerase são mostrados em roxo; os genes que codificam os fatores de alongamento estão em azul. As r-proteínas da subunidade ribossomal grande (50S) são designadas L1 a L34; aquelas da subunidade menor (30S), S1 a S21.

excede aquele do rRNA. Isso garante que a tradução dos mRNA que codificam as r-proteínas seja reprimida apenas quando a síntese dessas r-proteínas excede aquela necessária para fazer ribossomos funcionais. Desse modo, a velocidade da síntese de r-proteína é mantida em equilíbrio com a disponibilidade de rRNA.

O sítio de ligação do mRNA para o repressor da tradução está próximo do sítio de início da tradução de um dos genes no óperon, geralmente o primeiro gene (Figura 28-21). Em outros óperons isso afetaria apenas aquele gene, porque nos mRNA policistrônicos bacterianos a maioria dos genes tem sinais de tradução independentes. Nos óperons de r-proteínas, no entanto, a tradução de um gene depende da tradução de todos os outros. O mecanismo desse acoplamento da tradução ainda não é conhecido em detalhe. Entretanto, em alguns casos, a tradução de genes múltiplos parece ser bloqueada pela dobra do mRNA em uma estrutura elaborada tridimensional que é estabilizada tanto por pareamento interno de bases (como na Figura 8-24) quanto por ligação da proteína repressora de tradução. Quando o repressor da tradução está ausente, a ligação de ribossomos e a tradução de um ou mais genes desfaz a estrutura dobrada do mRNA, permitindo que todos os genes sejam traduzidos.

Como a síntese de r-proteínas é coordenada com o rRNA disponível, a regulação da produção de ribossomos reflete a regulação da síntese de rRNA. Em *E. coli*, a síntese de rRNA a partir de sete óperons de rRNA responde à velocidade de crescimento celular e a alterações na disponibilidade de nutrientes cruciais, particularmente aminoácidos. A regulação coordenada pelas concentrações de aminoácidos é conhecida como **resposta estringente** (**Figura 28-22**). Quando as concentrações de aminoácidos são baixas, a síntese de rRNA é interrompida. A falta de aminoácidos leva à ligação de tRNA não carregados ao sítio ribossomal A; isso dispara uma sequência de eventos que se inicia com a ligação de uma enzima chamada **fator estringente** (proteína RelA) ao ribossomo. Quando ligado ao ribossomo, o fator estringente catalisa a formação do nucleotídeo raro guanosina tetrafosfato (ppGpp; ver Figura 8-39); ele adiciona pirofosfato à posição 3′ do GTP, na reação

$$\text{GTP} + \text{ATP} \rightarrow \text{pppGpp} + \text{AMP}$$

e então uma fosfo-hidrolase remove um fosfato para formar ppGpp. O aumento abrupto nos níveis de ppGpp em resposta à falta de aminoácidos resulta em uma grande redução na síntese de rRNA, mediada pelo menos em parte pela ligação de ppGpp à RNA-polimerase.

O nucleotídeo ppGpp, junto com a cAMP, pertence a uma classe de nucleotídeos modificados que atuam como mensageiros celulares secundários (p. 308). Em *E. coli*, esses dois nucleotídeos servem como sinais de fome; eles provocam grandes alterações no metabolismo celular aumentando ou diminuindo a transcrição de centenas de genes. Em células eucarióticas, mensageiros secundários similares de nucleotídeos também têm funções regulatórias múltiplas. A coordenação do metabolismo celular com o crescimento da célula é altamente complexa, e mecanismos regulatórios adicionais, sem dúvida, ainda não foram descobertos.

**FIGURA 28-22 Resposta estringente em *E. coli*.** Essa resposta à privação de aminoácidos é disparada pela ligação de um tRNA sem carga no sítio A do ribossomo. Uma proteína chamada de fator estringente se liga ao ribossomo e catalisa a síntese de pppGpp, que é convertida por uma fosfo-hidrolase a ppGpp. O sinalizador ppGpp reduz a transcrição de alguns genes e aumenta aquela de outros, em parte ao se ligar à subunidade $\beta$ da RNA-polimerase e alterar a especificidade do promotor da enzima. A síntese de rRNA é reduzida quando os níveis de ppGpp aumentam.

## O funcionamento de alguns mRNA é regulado por pequenos RNA em *cis* ou em *trans*

Como descrito ao longo desse capítulo, as proteínas desempenham um papel importante bem documentado na regulação da expressão gênica. O RNA, porém, também tem um papel crucial – papel este que está sendo mais bem reconhecido à medida que mais exemplos de RNA regulatórios são descobertos. Uma vez que um mRNA seja sintetizado, suas funções podem ser controladas por proteínas de ligação ao DNA, como visto para os óperons de r-proteínas recém-descritos, ou por um RNA. Uma molécula de RNA separada pode se ligar ao mRNA "em *trans*" e afetar sua atividade. Alternativamente, uma porção do próprio mRNA pode regular seu próprio funcionamento. Quando parte de uma molécula afeta o funcionamento de outra parte da mesma molécula, se fala que ela atua "em *cis*".

Um exemplo bem caracterizado de regulação do RNA em *trans* é visto na regulação do mRNA do gene *rpoS* (fator sigma da RNA-polimerase), que codifica $\sigma^S$, um dos sete fatores sigma de *E. coli* (ver Tabela 26-1). A célula usa esse fator de especificidade em certas situações de estresse, como quando entra em fase estacionária (estado de ausência de crescimento, necessário devido à ausência de nutrientes) e $\sigma^S$ é necessário para transcrever grande número de genes de resposta. O mRNA $\sigma^S$ está presente em níveis baixos na maioria das condições mas não é traduzido, porque uma grande estrutura em grampo anterior à região codificadora inibe a ligação dos ribossomos (**Figura 28-23**). Sob certas condições de estresse, um ou dois RNA pequenos de função especial, DsrA (abaixo da região A) e RprA (*r*egulador *Rp*os do RNA *A*), são induzidos. Ambos podem parear com uma fita do grampo no $\sigma^S$ mRNA, desfazendo o grampo e assim permitindo a tradução do *rpoS.* Outro pequeno RNA, OxyS (estresse *ox*idativo do gene *S*), é induzido sob condições de estresse oxidativo e inibe a tradução do *rpoS*, provavelmente ao parear com e bloquear o sítio de ligação de ribossomos no mRNA. O OxyS é expresso como parte de um sistema que responde a um tipo diferente de estresse (dano oxidativo) do que o *rpoS*, e sua tarefa é a de impedir a expressão de vias de reparo indesejadas. DsrA, RprA e OxyS são todas moléculas de RNA bacteriano relativamente pequenas (menos de 300 nucleotídeos), designadas sRNA (*s* de *s*mall, pequenas; existem, é claro, outros RNA "pequenos" com outras designações em eucariotos). Todos precisam para o seu funcionamento de uma proteína chamada Hfq, chaperona de RNA que facilita o pareamento RNA-RNA. Os genes bacterianos regulados desse modo são poucos em número, apenas poucas dúzias

**FIGURA 28-23 Regulação do funcionamento do mRNA bacteriano em trans *pelos* sRNA.** Vários RNA (pequenos RNA) – DsrA, RprA e OxyS – estão envolvidos na regulação do gene *rpoS*. Todos precisam da proteína Hfq, uma chaperona de RNA que facilita o pareamento RNA-RNA. A Hfq tem uma estrutura toroide, com um poro no centro. **(a)** A DsrA promove a tradução ao se parear com uma fita de uma estrutura em grampo que, de outra forma, bloqueia o sítio de ligação do ribossomo. A RprA (não mostrada) atua de um modo semelhante. **(b)** A OxyS bloqueia a tradução ao se parear com o sítio de ligação do ribossomo.

**FIGURA 28-24 Regulação do funcionamento do mRNA bacteriano em *cis* por *riboswitches*.** Os modos de ação conhecidos são ilustrados por vários *riboswitches* com base em um aptâmero natural muito difundido que se liga à tiamina pirofosfato. A ligação de TPP ao aptâmero leva a uma mudança conformacional que produz os resultados variáveis ilustrados nas partes **(a)**, **(b)** e **(c)** nos diferentes sistemas em que o aptâmero é utilizado.

em uma espécie bacteriana típica. Entretanto, esses exemplos fornecem bons sistemas modelo para compreender os padrões presentes nos exemplos mais complexos e numerosos de regulação mediada por RNA em eucariotos.

A regulação em *cis* envolve uma classe de estruturas de RNA conhecidas como ***riboswitches***. Como descrito no Quadro 26-3, aptâmeros são moléculas de RNA, geradas *in vitro*, capazes de ligação específica a um tipo particular de ligante. Como se pode esperar, tais domínios de RNA ligadores de ligantes também estão presentes na natureza – em *riboswitches* – em um número significativo de mRNA bacterianos (e mesmo em alguns mRNA eucarióticos). Esses aptâmeros naturais são domínios estruturados encontrados em regiões não traduzidas nas extremidades 5′ de certos mRNA bacterianos. A ligação de um *riboswitch* de mRNA ao seu ligante apropriado resulta em uma mudança conformacional no mRNA, e a transcrição é inibida pela estabilização de uma estrutura prematura de terminação da transcrição, ou a tradução é inibida (em *cis*) pela oclusão do sítio de ligação de ribossomos (**Figura 28-24**). Na maioria dos casos, o *riboswitch* atua em um tipo de alça de *feedback*. A maioria dos genes regulados desse modo está envolvida na síntese ou transporte do ligante que é ligado pelo *riboswitch*; assim, quando o ligante está presente em altas concentrações, o *riboswitch* inibe a expressão dos genes necessários para reabastecer esse ligante.

Cada *riboswitch* se liga a apenas um ligante. Foram detectados *riboswitches* distintos que respondem a mais de uma dúzia de diferentes ligantes, incluindo tiamina pirofosfato (TPP, vitamina $B_1$), cobalamina (vitamina $B_{12}$), flavina mononucleotídeo, lisina, *S*-adenosilmetionina (adoMet), purinas, *N*-acetilglicosamina-6-fosfato e glicina. É provável que muitos mais ainda sejam descobertos. O *riboswitch* que responde ao TPP parece ser o mais difundido; ele é encontrado em muitas bactérias, fungos e algumas plantas. O *riboswitch* do TPP bacteriano inibe a tradução em algumas espécies e induz a terminação prematura da transcrição em outras (Figura 28-24). O *riboswitch* de TPP eucariótico é encontrado nos íntrons de certos genes e modula o *splicing* alternativo daqueles genes (ver Figura 26-21). Ainda não está claro como são os *riboswitches*. Entretanto, estimativas sugerem que mais de 4% dos genes de *Bacillus subtilis* sejam regulados por *riboswitches*.

À medida que os *riboswitches* são mais bem entendidos, pesquisadores estão encontrando aplicações médicas. Por exemplo, a maioria dos *riboswitches* descritos até o momento, incluindo aquele que responde à adoMet, foram encontrados apenas em bactérias. Um fármaco que se ligasse e ativasse o *riboswitch* adoMet desligaria os genes que codificam enzimas que sintetizam e transportam adoMet, privando as células bacterianas desse cofator essencial. Fármacos desse tipo estão sendo buscados para uso como uma nova classe de antibióticos. ■

O ritmo de descoberta de RNA funcionais não mostra sinais de diminuição e continua a enriquecer a hipótese de que o RNA desempenhou um papel especial na evolução da vida (Capítulo 26). Os RNA e os *riboswitches*, como as ribozimas e ribossomos, podem ser vestígios de um mundo de RNA obscurecido pelo tempo, mas persistindo em uma rica série de dispositivos biológicos ainda em funcionamento na biosfera atual. A seleção em laboratório de aptâmeros e ribozimas com novas funções de ligação de ligantes e enzimáticas (ver Quadro 26-3) nos informa que são possíveis as atividades, com base em RNA, necessárias para um mundo de RNA viável. A descoberta de várias das mesmas funções do RNA em muitos organismos nos mostra que, de fato, existem componentes essenciais ao metabolismo com base em RNA. Por exemplo, os aptâmeros naturais de *riboswitches* podem ser derivados de RNA que, bilhões de anos atrás, se ligaram aos cofatores necessários para promover os processos enzimáticos necessários para o metabolismo do mundo de RNA.

## Alguns genes são regulados por recombinação genética

Agora será abordado outro modo de regulação gênica bacteriana, no nível de rearranjo-recombinação de DNA.

**FIGURA 28-25** ***Salmonella typhimurium*, com flagelos evidentes.**

A *Salmonella typhimurium*, que habita o intestino de mamíferos, se move girando o flagelo na sua superfície celular (**Figura 28-25**). As várias cópias da proteína flagelina ($M_r$ 53.000) que compõem o flagelo são alvo de destaque dos sistemas imunes de mamíferos. Porém, as células de *Salmonella* têm um mecanismo que evita a resposta imune: elas alternam entre duas proteínas flagelinas distintas (FljB e FliC) aproximadamente uma vez a cada 1.000 gerações, usando um processo chamado **variação de fase**.

A troca é realizada pela inversão periódica de um segmento de DNA contendo o promotor para um gene da flagelina. A inversão é uma reação de recombinação sítio-específica (ver Figura 25-37) mediada pela recombinase Hin em sequências específicas de 14 pb (sequências *hix*) em cada extremidade do segmento de DNA. Quando o segmento de DNA está em uma orientação, o gene para a flagelina FljB e

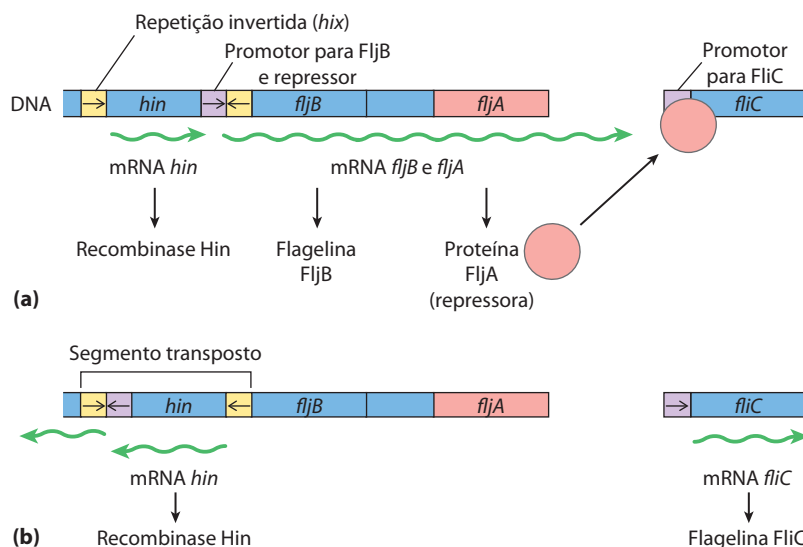



**FIGURA 28-26 Regulação dos genes de flagelina em *Salmonella*: variação de fase.** Os produtos dos genes *fliC* e *fljB* são flagelinas diferentes. O gene *hin* codifica a recombinase que catalisa a inversão do segmento de DNA contendo o promotor *fljB* e o gene *hin*. Os sítios de recombinação (repetições invertidas) são chamados de *hix* (amarelo). **(a)** Em uma orientação, *fljB* é expressa junto com uma proteína repressora (produto de um gene *fljA*) que reprime a transcrição do gene *fliC*. **(b)** Na orientação oposta, apenas o gene *fliC* é expresso; os genes *fljA* e *fljB* não podem ser transcritos. A interconversão entre estes dois estados, conhecida como variação de fase, também requer duas outras proteínas não específicas de ligação de DNA (não mostradas), HU e FIS.

**TABELA 28-1** Exemplos de regulação gênica por recombinação

| Sistema | Recombinase/sítio de recombinação | Tipo de recombinação | Função |
|---|---|---|---|
| Variação de fase (*Salmonella*) | Hin/*hix* | Sítio-específica | A expressão alternativa de dois genes da flagelina permite a evasão da resposta imune do hospedeiro. |
| Amplitude de hospedeiros (bacteriófago $\mu$) | Gin/*gix* | Sítio-específica | A expressão alternativa de dois conjuntos de genes de fibras caudais afeta a faixa de hospedeiros. |
| Troca do tipo de acasalamento (levedura) | HO-endonuclease, proteína RAD52, outras proteínas/*MAT* | Conversão gênica não recíproca* | A expressão alternativa de dois tipos de acasalamento de leveduras, a e $\alpha$, cria células que podem se unir e sofrer meiose. |
| Variação antigênica (tripanossomas)[†] | Varia | Conversão gênica não recíproca* | A expressão sucessiva de diferentes genes codificando glicoproteínas variáveis de superfície (VSG) permite a evasão da resposta imune do hospedeiro. |

* Na conversão gênica não recíproca (classe de eventos de recombinação não discutida no Capítulo 25), a informação genética é movida de uma parte do genoma (onde é silenciosa) para outra (onde é expressa). A reação é semelhante à transposição replicativa (ver Figura 25-41).
[†] Os tripanossomos provocam a doença do sono africana e outras doenças (ver Quadro 6-3). A superfície externa de um tripanossomo é composta por múltiplas cópias de um único VSG, o antígeno principal de superfície. Uma célula pode mudar os antígenos de superfície em mais de 100 formas diferentes, impedindo uma defesa eficaz do sistema imune do hospedeiro.

o gene que codifica um repressor (FljA) são expressos (**Figura 28-26a**); o repressor desliga a expressão do gene para a flagelina FliC. Quando o segmento de DNA é invertido (Figura 28-26b), os genes *fljA* e *fljB* não são mais transcritos e o gene *fliC* é induzido à medida que o repressor começa a se esgotar. A recombinase Hin, codificada pelo gene *hin* no segmento de DNA que sofre inversão, é expressa quando o segmento de DNA está em qualquer orientação, de modo que a célula pode sempre trocar de um estado para outro.

Esse tipo de mecanismo regulatório tem a vantagem de ser absoluto: a expressão gênica é impossível quando o gene está fisicamente separado do seu promotor (observe a posição do promotor *fljB* na Figura 28-26b). Um interruptor ligado/desligado absoluto pode ser importante nesse sistema (embora ele afete apenas um dos dois genes de flagelinas), porque um flagelo com apenas uma cópia da flagelina errada pode ser vulnerável para abrigar anticorpos contra aquela proteína. O sistema *Salmonella* não é de maneira nenhuma único. Sistemas regulatórios semelhantes ocorrem em algumas outras bactérias e em alguns bacteriófagos, e sistemas de recombinação com funções semelhantes foram encontrados em eucariotos (Tabela 28-1). A regulação gênica por rearranjos de DNA que move genes e/ou promotores é particularmente comum em patógenos que se beneficiam pela alteração de seu leque de hospedeiros ou alterando suas proteínas de superfície, suplantando os sistemas imunes dos hospedeiros.

## RESUMO 28.2 Regulação da expressão gênica em bactérias

- Além da repressão do repressor Lac, o óperon *lac* de *E. coli* sofre regulação positiva pela proteína receptora de cAMP (CRP). Quando a glicose é baixa, a cAMP é alta e a CRP-cAMP se liga a um sítio específico no DNA, estimulando a transcrição do óperon *lac* e produção de enzimas metabolizadoras de lactose. A presença de glicose deprime a cAMP, diminuindo a expressão do *lac* e de outros genes envolvidos no metabolismo de açúcares secundários. Um grupo de óperons regulados coordenadamente é chamado de regulon.
- Óperons que produzem as enzimas da síntese de aminoácidos têm um circuito regulatório chamado atenuação, que usa um sítio de terminação de transcrição (o atenuador) no mRNA. A formação do atenuador é modulada por um mecanismo que acopla transcrição e tradução enquanto responde a pequenas alterações na concentração de aminoácidos.
- No sistema SOS, múltiplos genes não ligados reprimidos por um único repressor são induzidos simultaneamente quando o dano no DNA dispara a proteólise autocatalítica do repressor facilitada pela proteína RecA.
- Na síntese de proteínas ribossomais, uma proteína em cada óperon de r-proteína atua como repressor da tradução. O mRNA é ligado pelo repressor e a tradução é bloqueada apenas quando a r-proteína está presente com excesso de rRNA disponível.
- A regulação pós-transcrição de alguns mRNA é mediada por pequenos RNA que atuam em *trans* ou por *riboswitches*, parte da própria estrutura do mRNA, que atua em *cis*.
- Alguns genes são regulados por processos de recombinação genética que movem os promotores em relação aos genes sendo regulados. A regulação também pode ocorrer no nível da tradução.

## 28.3 Regulação da expressão gênica em eucariotos

A iniciação da transcrição é um ponto de regulação crucial para a expressão gênica em todos os organismos. Embora os eucariotos e bactérias usem alguns semelhantes mecanismos regulatórios, a regulação da transcrição nos dois sistemas é fundamentalmente diferente.

É possível definir um estado fundamental de transcrição como a atividade inerente de promotores e da maquinaria de transcrição *in vivo* na ausência de sequências regulatórias. Em bactérias, a RNA-polimerase geralmente tem acesso a todos os promotores e pode se ligar e iniciar a transcrição com algum nível de eficiência na ausência de ativadores ou repressores; o estado fundamental de transcrição é, portanto, não restritivo. Em eucariotos, no entanto, promotores fortes são geralmente inativos *in vivo* na ausência de proteínas regulatórias; isto é, o estado fundamental de transcrição é restritivo. Essa diferença fundamental origina pelo menos quatro características importantes que distinguem a regulação da expressão gênica em eucariotos daquela em bactérias.

Primeiro, o acesso a promotores eucarióticos é restrito pela estrutura da cromatina, e a ativação da transcrição é associada com várias mudanças na estrutura da cromatina na região transcrita. Segundo, embora as células eucarióticas tenham tanto mecanismos regulatórios positivos quanto negativos, os mecanismos positivos predominam em todos os sistemas caracterizados até agora. Assim, uma vez que o estado fundamental de transcrição é restritivo, praticamente todo gene de eucariotos precisa de ativação para ser transcrito. Terceiro, células eucarióticas têm proteínas regulatórias multiméricas maiores e mais complexas do que as de bactérias. Finalmente, a transcrição no núcleo eucariótico é separada da tradução no citoplasma tanto no tempo como no espaço.

A complexidade de circuitos regulatórios em células eucarióticas é extraordinária, como a discussão a seguir mostra. A seção é concluída com uma descrição ilustrada de um dos mais elaborados circuitos: a cascata regulatória que controla o desenvolvimento em moscas-da-fruta.

### A cromatina ativa na transcrição é estruturalmente distinta da cromatina inativa

Os efeitos da estrutura do cromossomo na regulação gênica em eucariotos não possui um paralelo claro em bactérias. No ciclo da célula eucariótica, os cromossomos da interfase parecem, à primeira vista, dispersos e amorfos (ver Figura 24-24). No entanto, várias formas de cromatina podem ser encontradas ao longo desses cromossomos. Cerca de 10% da cromatina em uma típica célula eucariótica estão em forma mais condensada do que o resto da cromatina. Essa forma, **heterocromatina**, é inativa na transcrição. A heterocromatina é geralmente associada a estruturas cromossômicas particulares – os centrômeros, por exemplo. A cromatina restante, menos condensada, é chamada de **eucromatina**.

A transcrição de um gene de eucariotos é fortemente reprimida quando o seu DNA está condensado no interior da heterocromatina. Parte da eucromatina, mas não toda, é ativa na transcrição. As regiões dos cromossomos ativas na transcrição são distintas da heterocromatina por pelo menos três maneiras: o posicionamento dos nucleossomos, a presença de variantes de histonas e a modificação covalente dos nucleossomos. Essas mudanças estruturais na cromatina associadas à transcrição são coletivamente chamadas de **remodelação da cromatina**. A remodelação envolve enzimas que promovem essas alterações (Tabela 28-2).

Cinco famílias conhecidas de complexos enzimáticos reposicionam ativamente ou deslocam os nucleossomos, hidrolisando o ATP no processo. Três desses são particularmente importantes na ativação da transcrição (Tabela 28-2; consulte na nota de rodapé da tabela uma explicação sobre os nomes abreviados dos complexos enzimáticos aqui descritos). O **SWI/SNF**, encontrado em todas as células eucarióticas, contém pelo menos seis polipeptídeos nucleares que juntos remodelam a cromatina de modo que os nucleossomos se tornam mais irregularmente espaçados. Também estimulam a ligação do fator de transcrição. O complexo inclui um componente chamado de bromodomínio perto da terminação carboxila da subunidade ATPase ativa, que interage com as caudas de histonas acetiladas. O SWI/SNF não é necessário para a transcrição de todos os genes. **NURF**, membro da família ISW1, remodela a cromatina de formas que complementam e se sobrepõem à atividade da SWI/SNF. Esses dois complexos enzimáticos são cruciais na preparação de uma região da cromatina para a transcrição ativa. A terceira família de proteínas importante apresenta um papel um pouco diferente. A cromatina ativa na transcrição tende a ser deficiente em histona H1, que se liga ao DNA de ligação entre as partículas do nucleossomo. Essas regiões de cromatina também são enriquecidas das variantes de histonas H3.3 e H2AZ (ver Quadro 24-2). Alterações no conteúdo de histonas são novamente mediadas por enzimas especializadas e complexos proteicos. A deposição de H2AZ envolve membros dessa terceira família de enzimas remodeladoras dependentes de ATP, chamadas de **SWR1**.

A modificação covalente de histonas é alterada drasticamente no interior da cromatina ativa na transcrição. As histonas nucleares das partículas dos nucleossomos (H2A, H2B, H3, H4; ver Figura 24-26) são modificadas pela metilação de resíduos Lys ou Arg, fosforilação de resíduos de Ser ou Thr, acetilação (ver a seguir), ubiquitinação (ver Figura 27-47) ou sumoilação. Cada uma das histonas nucleares apresenta dois domínios estruturais distintos. Um domínio central está envolvido na interação histona-histona e no enrolamento do DNA em torno do nucleossomo. Um segundo domínio, aminoterminal rico em lisina, está geralmente posicionado próximo do exterior da partícula do nucleossomo montado; as modificações covalentes ocorrem em resíduos específicos concentrados nesse domínio aminoterminal. Os padrões de modificação levaram alguns pesquisadores a propor a existência de um código para as histonas, no qual padrões de modificação são reconhecidos por enzimas que alteram a estrutura da cromatina. De fato, algumas das modificações são essenciais para interações com proteínas que desempenham papéis chave na transcrição.

**TABELA 28-2** Alguns complexos enzimáticos que catalisam mudanças estruturais da cromatina associadas à transcrição

| Complexo enzimático* | Estrutura oligomérica (nº de polipeptídeos) | Fonte | Atividades |
|---|---|---|---|
| **Modificação de histonas** | | | |
| GCN5 – ADA2 – ADA3 | 3 | Leveduras | GCN5 tem atividade de HAT tipo A |
| SAGA/ PCAF | >20 | Eucariotos | Inclui GCN5-ADA2-ADA3; resíduos acetilados em H3 e H2B |
| NuA4 | Pelo menos 12 | Eucariotos | Componente EsaI tem atividade HAT; acetila H4, H2A e H2AZ |
| **Movimento de histona/enzimas de substituição que precisam de ATP** | | | |
| SWI/SNF | ≥6; $M_r$ total $2\times10^6$ | Eucariotos | Remodelagem de nucleossomos; ativação da transcrição |
| Família ISWI | Varia | Eucariotos | Remodelagem de nucleossomos; repressão da transcrição; ativação da transcrição em alguns casos (NURF) |
| Família SWR1 | ~12 | Eucariotos | Deposição de H2AZ |
| **Chaperonas de histonas que não precisam de ATP** | | | |
| HIRA | 1 | Eucariotos | Deposição de H3.3 durante a transcrição |

*As abreviações dos genes e proteínas eucarióticos são frequentemente mais confusas ou obscuras do que as abreviações usadas para bactérias. O complexo de proteínas GCN5 (controle geral não desrepressível, de *general control nonderepressible*) e ADA (alteração/ativação da deficiência, de *alteration/deficiency activation*) foi descoberto durante a investigação da regulação dos genes do metabolismo do nitrogênio em leveduras. Essas proteínas podem fazer parte do complexo maior SAGA (SPF, ADA2,3, GCN5, acetiltransferase) nas leveduras. O equivalente do SAGA em humanos é o PCAF (fator associado a *p*300/CBP). NuA4 é a acetiltransferase de nucleossomos de H4; ESA1 é a acetiltransferase essencial relacionada à SAS2. SWI (troca, *switching*) foi descoberta como uma proteína necessária para a expressão de certos genes envolvidos na troca do *mating type* em leveduras, e SNF (sacarose não fermentadora) como um fator de expressão do gene de leveduras para sacarase. Estudos posteriores revelaram múltiplas proteínas SWI e SNF que atuavam em um complexo. O complexo SWI/SNF tem um papel na expressão de um amplo número de genes e foi encontrado em muitos eucariotos, inclusive humanos. ISWI é *i*mitação de *SWI*; NURF, o fator de remodelagem nuclear (*nuclear remodeling factor*); SWR1, uma Swi2/ATPase 1 relacionada à Snf2 e HIRA, um regulador de histonas tipo A.

A acetilação e metilação de histonas figura com destaque nos processos que ativam a cromatina para transcrição. Durante a transcrição, a histona H3 é metilada (por metilases de histona específicas) na $Lys^4$ em nucleossomos perto da extremidade 5′ da região codificadora e na $Lys^{36}$ por toda a região codificadora. Essas metilações facilitam a ligação das **acetiltransferases de histona** (**HATs**), enzimas que acetilam resíduos específicos de Lys. HAT do citosol (tipo B) acetilam histonas recentemente sintetizadas antes das histonas serem importadas para o núcleo. A montagem posterior de histonas na cromatina após a replicação é facilitada pelas chaperonas de histonas: CAF1 para H3 e H4, (ver Quadro 24-2), e NAP1 para H2A e H2B.

Onde a cromatina está sendo ativada para transcrição, as histonas nucleossomais são acetiladas adicionalmente por HAT nucleares (tipo A). A acetilação de múltiplos resíduos Lys nos domínios aminoterminais das histonas H3 e H4 pode reduzir a afinidade de todo o nucleossomo por DNA. A acetilação de resíduos Lys específicos é crucial para a interação de nucleossomos com outras proteínas. Quando a transcrição de um gene não é mais necessária, o grau de acetilação de nucleossomos naquela vizinhança é reduzido pela atividade das **desacetilases de histonas** (**HDAC**), como parte de um processo geral de silenciamento de genes que restaura a cromatina a um estado transcricionalmente inativo. Além da remoção de certos grupos acetil, nova modificação covalente de histonas marca a cromatina como transcricionalmente inativa. Por exemplo, a $Lys^9$ da histona H3 é frequentemente metilada em heterocromatina.

O efeito final da remodelação da cromatina no contexto da transcrição é o de tornar um segmento de cromossomo mais acessível e “marcá-lo” (modificar quimicamente) para facilitar a ligação e atividade dos fatores de transcrição que regulam a expressão do gene ou genes naquela região.

## A maioria dos promotores eucarióticos é regulada positivamente

Como já observado, as RNA-polimerases de eucariotos têm pouca ou nenhuma afinidade intrínseca por seus promotores; a iniciação da transcrição é quase sempre dependente da ação de proteínas ativadoras múltiplas. Uma razão importante para o aparente predomínio da regulação positiva parece óbvia: o armazenamento do DNA no interior da cromatina efetivamente torna a maioria dos promotores inacessíveis, de modo que os genes são silenciosos na ausência de outra regulação. A estrutura de cromatina afeta o acesso a alguns promotores mais do que outros, mas repressores que se ligam ao DNA de modo a impedir o acesso da RNA-polimerase (regulação negativa) seriam, com frequência, simplesmente redundantes. Outros fatores devem estar em jogo no uso da regulação positiva e geralmente especulações sobre isso se

centram em torno de dois: o grande tamanho dos genomas eucarióticos e a maior eficiência da regulação positiva.

Primeiro, a ligação de DNA não específico de proteínas regulatórias se torna um problema importante nos genomas bem maiores dos eucariotos superiores. E a chance de que uma única sequência de ligação específica ocorra aleatoriamente em um local inadequado também aumenta com o tamanho do genoma. Um controle combinatorial, portanto, se torna importante em um genoma grande (**Figura 28-27**). A especificidade pela ativação da transcrição pode ser melhorada se cada uma de várias proteínas regulatórias positivas ligar sequências de DNA específicas para ativar um gene. O número médio de sítios regulatórios para um gene em um organismo pluricelular é seis, e são comuns genes regulados por uma dúzia desses sítios. A necessidade de ligação de várias proteínas regulatórias positivas a sequências específicas de DNA reduz enormemente a probabilidade de ocorrência aleatória de uma justaposição funcional de todos os sítios de ligação necessários. Além disso, o número real de proteínas regulatórias que deve ser codificado por um genoma para regular todos os seus genes pode ser reduzido (Figura 28-27). Portanto, um novo regulador não é necessário para cada gene, embora a regulação seja complexa o suficiente em eucariotos superiores, de modo que as proteínas reguladoras podem representar de 5% a 10% de todos os genes codificadores de proteínas. Em princípio, uma estratégia combinatória semelhante poderia ser usada por múltiplos elementos regulatórios negativos, mas isso nos leva à segunda razão para o uso da regulação positiva: ela é simplesmente mais eficiente. Se os ~25.000 genes no genoma humano fossem regulados negativamente, cada célula teria de sintetizar, em todos os momentos, todos os diferentes repressores em concentrações suficientes para permitir a ligação específica a cada gene "indesejado". Em uma regulação positiva, a maioria dos genes é geralmente inativa (isto é, as RNA-polimerases não se ligam aos promotores) e a célula sintetiza apenas as proteínas ativadoras necessárias para promover a transcrição de um subconjunto de genes necessário na célula naquele momento. Apesar desses argumentos, há exemplos de regulação negativa em eucariotos, desde leveduras ao homem, como será visto.

## Ativadores de ligação de DNA e coativadores facilitam a montagem dos fatores gerais de transcrição

Continuando o estudo da regulação da expressão gênica em eucariotos, serão abordadas as interações entre promotores e RNA-polimerase II (Pol II), a enzima responsável pela síntese de mRNAs de eucariotos. Embora muitos (mas não todos) promotores de Pol II incluam a TATA *box* e sequências Inr (iniciadoras), com seu espaçamento padrão (ver Figura 26-8), eles variam enormemente tanto no número quanto na localização de sequências adicionais necessárias para a regulação da transcrição.

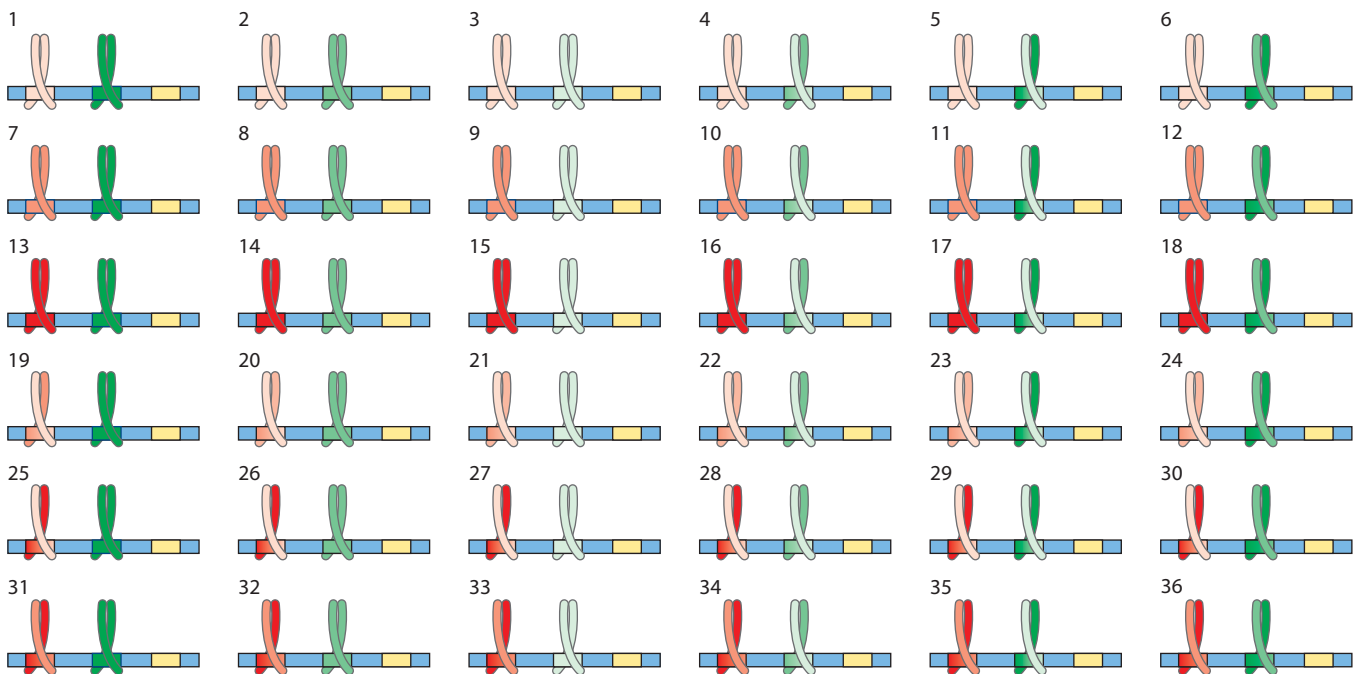



**FIGURA 28-27** **As vantagens do controle combinatório.** O controle combinatório permite a regulação específica de vários genes usando um repertório limitado de proteínas regulatórias. Considere as possibilidades inerentes à regulação por duas famílias diferentes de proteínas zíper de leucina (vermelho e verde). Se cada família de genes regulatórios tem três membros (mostrados aqui em tons escuro, médio e claro, cada um deles se ligando a uma sequência de DNA diferente) que pode livremente formar homo- ou heterodímeros, há seis espécies diméricas possíveis em cada família, cada uma das quais reconheceria uma sequência regulatória bipartide de DNA diferente. Se um gene tivesse um sítio regulatório para cada família de proteína, 36 combinações regulatórias diferentes seriam possíveis, usando apenas seis proteínas dessas duas famílias. Com seis ou mais sítios usados na regulação de um gene eucariótico típico, o número de variantes possíveis é muito maior do que esse exemplo sugere.

Sequências regulatórias adicionais, geralmente ligadas por ativadores de transcrição, são geralmente chamadas de **potenciadores** (*enhancers*) em eucariotos superiores e **sequências ativadoras a montante** (**UAS**) em leveduras. Um típico potenciador pode ser encontrado a centenas ou mesmo milhares de pares de bases a montante do início do sítio de transcrição, ou até mesmo a jusante dele, no interior do próprio gene. Quando ligado pelas proteínas regulatórias apropriadas, um potenciador aumenta a transcrição nos promotores vizinhos independente de sua orientação no DNA. As UAS de leveduras funcionam de modo similar, embora geralmente elas devam ser posicionadas a montante e a uma distância inferior a algumas centenas de pares de bases do sítio de início de transcrição.

A ligação bem-sucedida da holoenzima da RNA-polimerase II ativa a um dos seus promotores geralmente requer a ação combinada de proteínas, entre os cinco tipos que foram descritos até agora: (1) **ativadores de transcrição**, que se ligam a potenciadores ou UAS e facilitam a transcrição; (2) **reguladores da arquitetura**, que facilitam o *looping* do DNA; (3) **modificação da cromatina e proteínas remodeladoras**, descrita anteriormente; (4) **coativadores**; e (5) **fatores de transcrição basais** (ver Figura 26-9, Tabela 26-2), necessária na maior parte dos promotores da Pol II (**Figura 28-28**). Os coativadores atuam indiretamente – não se ligando ao DNA – e são necessários para a comunicação essencial entre os ativadores e o complexo composto da Pol II e dos fatores de transcrição basal (ou geral). Além disso, várias proteínas repressoras interferem com a comunicação entre a RNA-polimerase e os ativadores, resultando na repressão da transcrição (Figura 28-28b). Aqui serão focalizados os complexos de proteínas mostrados na Figura 28-28 e como eles interagem para ativar a transcrição.

**Ativadores da transcrição** As necessidades para ativadores variam muito de um promotor para outro. Alguns poucos ativadores são conhecidos por facilitar a transcrição em centenas de promotores, enquanto outros são específicos de alguns poucos promotores. Muitos ativadores são sensíveis à ligação de moléculas sinalizadoras, fornecendo a capacidade de ativar ou desativar a transcrição em resposta a um ambiente celular em mudança. Alguns potenciadores ligados por ativadores estão muito distantes da TATA *box* do promotor. Potenciadores múltiplos (frequentemente seis ou mais) são ligados por um número semelhante de ativa-

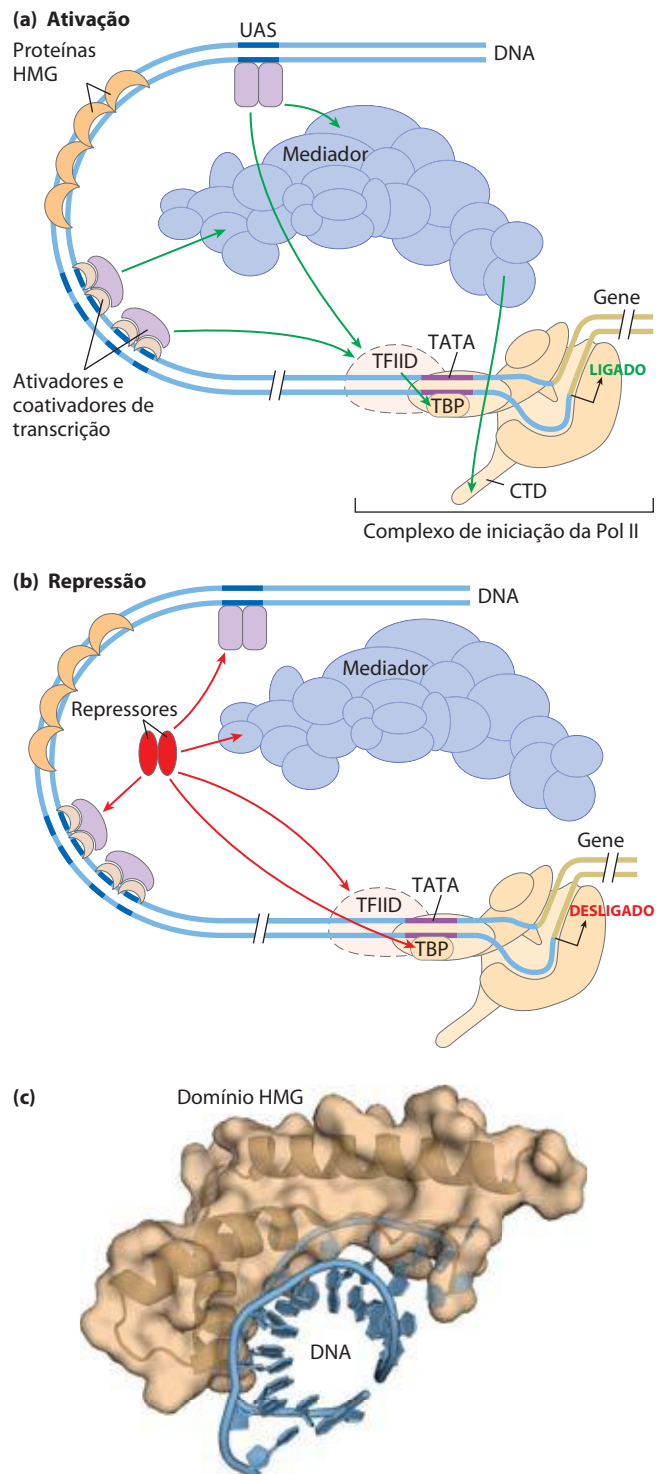



**FIGURA 28-28 Promotores eucarióticos e proteínas regulatórias.** A RNA-polimerase II e seus fatores de transcrição basal (geral) associados formam um complexo pré-iniciação na TATA *box* e o sítio Inr dos promotores cognatos, um processo facilitado pelos ativadores de transcrição, atuando por meio de coativadores (Mediador, TFIID ou ambos). **(a)** Um promotor composto com elementos de sequência típicos e complexos proteicos, encontrado tanto em leveduras quanto em eucariotos superiores. O domínio carboxila terminal (CTD) da Pol II (ver Figura 26-9) é um importante ponto de interação com o Mediador e outros complexos de proteínas. Enzimas de modificação de histonas (não mostradas) catalisam a metilação e acetilação; enzimas de remodelagem alteram o conteúdo e a localização dos nucleossomos. Os ativadores da transcrição têm domínios de ligação de DNA e domínios de ativação distintos. As setas verdes indicam modos de interação comuns comumente necessários para a ativação da transcrição, como discutido no texto. As proteínas HMG são um tipo comum de regulador de arquitetura (ver Figura 28-5), facilitando a formação de alças de DNA necessária para colocar juntos componentes do sistema ligados em sítios de ligação distantes. **(b)** Os repressores da transcrição de eucariotos funcionam por uma grande variedade de mecanismos. Alguns se ligam diretamente ao DNA, deslocando um complexo proteico necessário para a ativação (não mostrado); muitos outros interagem com várias partes dos complexos proteicos para impedir a ativação. Pontos possíveis de interação são indicados com setas vermelhas. **(c)** A estrutura de um complexo proteico HMG com DNA mostra como as proteínas HMG facilitam a formação de alças no DNA. A ligação é relativamente não específica, embora preferências de sequência de DNA tenham sido identificadas para várias proteínas HMG. É mostrado o domínio HMG da proteína HMG-D de *Drosophila*, ligada ao DNA (PDB ID 1QRV).

dores para um gene típico, fornecendo controle combinatório e resposta a múltiplos sinais.

**Reguladores de arquitetura** Como os ativadores funcionam a distância? A resposta na maioria dos casos parece ser que, como indicado anteriormente, o DNA interveniente faz uma alça de modo que vários complexos de proteínas podem interagir diretamente. A formação da alça é estimulada por reguladores de arquitetura abundantes na cromatina, que se ligam ao DNA com especificidade limitada. Com mais destaque, as proteínas do **grupo de alta mobilidade** (**HMG**) (Figura 28-28c; "alta mobilidade" se refere à sua mobilidade eletroforética nos géis de poliacrilamida) desempenham um papel estrutural importante na remodelação da cromatina e na ativação da transcrição.

**Complexos de proteínas coativadoras** A maior parte da transcrição requer a presença de complexos proteicos adicionais. Alguns dos principais complexos proteicos de proteínas reguladoras que interagem com a Pol II foram definidos tanto geneticamente quanto bioquimicamente. Esses complexos coativadores atuam como intermediários entre os ativadores da transcrição e o complexo Pol II.

Um coativador eucariótico principal, consistindo em 20 a 30 ou mais polipeptídeos em um complexo proteico, é chamado de **Mediador** (Figura 28-28). Muitos dos 20 polipeptídeos nucleares são altamente conservados de fungos ao homem. Um complexo adicional de quatro subunidades pode interagir com o Mediador e inibir a iniciação da transcrição. O Mediador se liga fortemente ao domínio da carboxila terminal (CTD) da maior subunidade de Pol II. O complexo Mediador é necessário tanto para a transcrição basal quanto para a regulada em vários dos promotores usados pela Pol II, e também estimula a fosforilação de CTD pela TFIIH (fator de transcrição basal). Os ativadores da transcrição interagem com um ou mais componentes do complexo Mediador, com os sítios de interação precisa diferindo de um ativador para outro. Complexos coativadores funcionam na TATA *box* do promotor ou perto dela.

Coativadores adicionais, funcionando com um ou poucos genes, também foram descritos. Alguns deles operam em conjunto com o Mediador e alguns podem atuar em sistemas que não empregam o Mediador.

**Proteína ligadora de TATA** O primeiro componente a se ligar na montagem de um **complexo de pré-iniciação** (**PIC**) na TATA *box* de um típico promotor Pol II é a **proteína ligadora de TATA** (**TBP**). Com frequência, a TBP faz parte de um complexo maior (~15 subunidades) chamado de TFIID. O complexo integral também inclui os fatores de transcrição basal TFIIB, TFIIE, TFIIF, TFIIH; Pol II; e talvez TFIIA. Esse PIC mínimo, no entanto, geralmente é insuficiente para a iniciação da transcrição e não se forma de modo algum se o promotor estiver obscurecido no interior da cromatina. A regulação positiva, levando à transcrição, é imposta pelos ativadores e coativadores.

**Coreografia da ativação da transcrição** Agora é possível começar a juntar a sequência de eventos de ativação da transcrição em um típico promotor de Pol II (**Figura 28-29**).

**FIGURA 28-29 Os componentes de ativação da transcrição.** Os ativadores se ligam primeiro ao DNA, recrutam os complexos de modificação de histonas/remodelagem do nucleossomo e um coativador como Mediador. O Mediador facilita a ligação de TBP (ou TFIID) e TFIIB, e então outros fatores de transcrição basal e a Pol II se ligam. A fosforilação do domínio carboxila terminal (CTD) da Pol II leva à iniciação da transcrição (não mostrado).

A ordem exata de ligação de alguns componentes pode variar, mas o modelo na Figura 28-29 ilustra os princípios de ativação bem como uma via comum. Muitos ativadores de transcrição têm uma afinidade significativa por seus sítios de ligação mesmo quando os sítios estão dentro da cromatina condensada. Em geral, a ligação dos ativadores é um evento que dispara a ativação seguinte do promotor. A ligação de um ativador pode permitir a ligação de outros, gradualmente deslocando alguns nucleossomos.

A remodelação da cromatina ocorre então em estágios, facilitados pelas interações entre ativadores e HAT ou complexos enzimáticos como SWI/SNF (ou ambos). Desse modo, um ativador ligado pode envolver outros componentes necessários para remodelação adicional da cromatina para permitir a transcrição de genes específicos. Os ativadores ligados interagem com o grande complexo Mediador. O Mediador, por sua vez, fornece uma superfície de montagem para a ligação da primeira TBP (ou TFIID), em seguida a TFIIB, e então outros componentes do PIC, incluindo a RNA-polimerase II. O Mediador estabiliza a ligação da Pol II e seus fatores de transcrição associados e facilita muito a formação do PIC. A complexidade nesses circuitos regulatórios é regra em vez de exceção, com múltiplos ativadores ligados ao DNA promovendo a transcrição.

O roteiro pode mudar de um promotor para outro. Por exemplo, muitos promotores têm um conjunto diferente de sequências de reconhecimento e podem não ter uma caixa TATA, e em eucariotos pluricelulares a composição de subunidades de fatores tais como o TFIID pode variar de um tecido para outro. Entretanto, parece que a maioria dos promotores precisa de um conjunto precisamente ordenado de componentes para iniciar a transcrição. O processo de montagem não é sempre rápido. Em alguns genes ele pode levar minutos; em certos genes de eucariotos superiores o processo pode levar dias.

**Ativação reversível da transcrição** Embora mais raras, algumas proteínas regulatórias de eucariotos que se ligam a promotores de Pol II ou que interagem com ativadores de transcrição podem atuar como repressores, inibindo a formação de PIC ativos (Figura 28-29). Alguns ativadores podem adotar diferentes conformações, tornando-os capazes de servir como ativadores de transcrição ou como repressores. Por exemplo, alguns receptores de hormônios esteroides (descritos posteriormente) funcionam no núcleo como ativadores de transcrição, estimulando a transcrição de certos genes quando um sinal de um hormônio esteroide particular está presente. Quando o hormônio está ausente, as proteínas receptoras revertem a uma conformação repressora, *impedindo* a formação de PIC. Em alguns casos essa repressão envolve a interação com diacetilases de histonas e outras proteínas que ajudam a restaurar a cromatina circundante ao seu estado inativo na transcrição. O Mediador, quando inclui as subunidades inibitórias, pode também bloquear a iniciação da transcrição. Esse pode ser um mecanismo regulatório para garantir a montagem ordenada do PIC (ao atrasar a ativação da transcrição até que todos os fatores necessários estejam presentes), ou pode ser um mecanismo que ajude a desativar promotores quando a transcrição não é mais necessária.

## Os genes do metabolismo da galactose em leveduras estão sujeitos tanto à regulação positiva quanto negativa

Alguns dos princípios gerais descritos acima podem ser ilustrados por um circuito regulatório eucariótico bem estudado (**Figura 28-30**). As enzimas necessárias para a importação e metabolismo de galactose em leveduras são

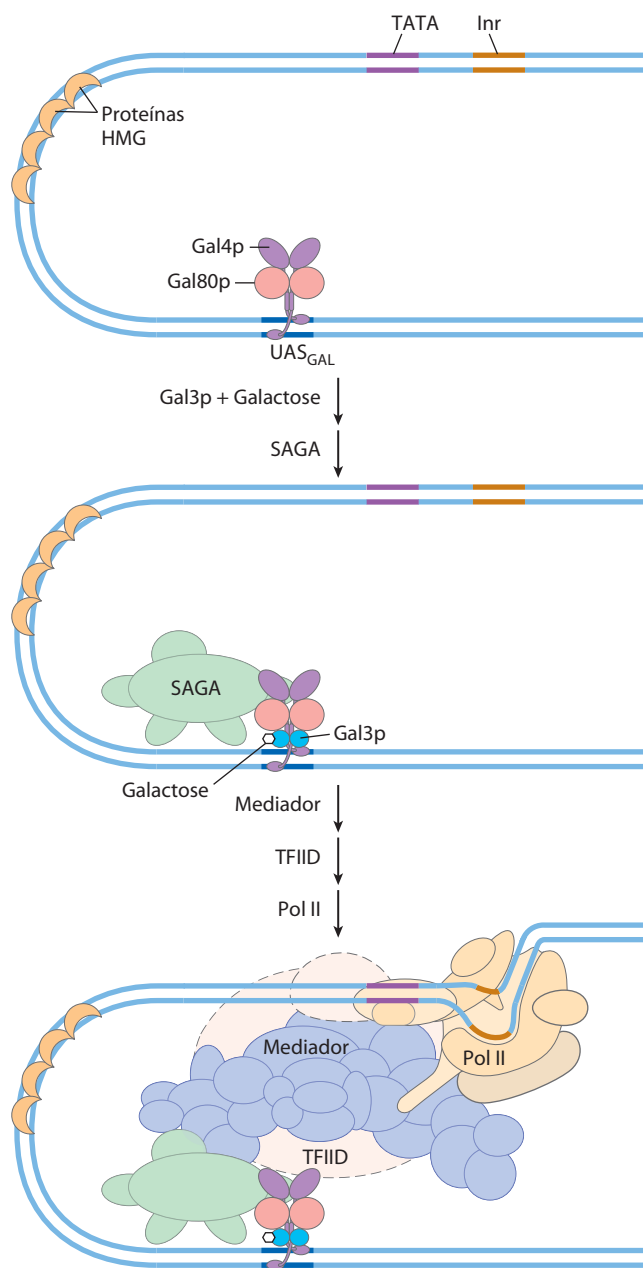



**FIGURA 28-30 Regulação da transcrição de genes *GAL* em leveduras.** A galactose importada para a célula de levedura é convertida em galactose-6-fosfato por uma via que envolve seis enzimas, cujos genes estão espalhados por três cromossomos (ver Tabela 28-3). A transcrição desses genes é regulada pelas ações combinadas das proteínas Gal4p, Gal80p e Gal3p, com Gal4p desempenhando o papel central de ativador da transcrição. O complexo Gal4p-Gal80p é inativo. A ligação da galactose a Gal3p leva à interação da Gal3p com o complexo Gal80p-Gal4p e ativa a Gal4p. Esta depois recruta SAGA, Mediador e TFIID para os promotores da galactose, levando ao recrutamento da DNA-polimerase II e iniciação da transcrição.

**TABELA 28-3** Genes do metabolismo da galactose em leveduras

| Gene | Função proteica | Localização nos cromossomos | Tamanho da proteína (número de resíduos) | Expressão proteica relativa usando diferentes fontes de carbono | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Glicose | Glicerol | Galactose |
| **Genes regulados** | | | | | | |
| *GAL1* | Galactocinase | II | 528 | – | – | +++ |
| *GAL2* | Galactose-permease | XII | 574 | – | – | +++ |
| *PGM2* | Fosfoglicomutase | XIII | 569 | + | + | ++ |
| *GAL7* | Galactose-1-fosfato uridililtransferase | II | 365 | – | – | +++ |
| *GAL10* | UDP-glicose-4-epimerase | II | 699 | – | – | +++ |
| *MEL1* | α-Galactosidase | II | 453 | – | + | ++ |
| **Genes reguladores** | | | | | | |
| *GAL3* | Indutor | IV | 520 | – | + | ++ |
| *GAL4* | Ativador da transcrição | XVI | 881 | +/– | + | + |
| *GAL80* | Inibidor da transcrição | XII | 435 | + | + | ++ |

**Fonte**: Adaptada de Reece, R. & Platt, A. (1997). Signaling activation and repression of RNA polymerase II transcription in yeast. *Bioessays* 19, 1001-1010.

codificadas por genes espalhados por vários cromossomos (Tabela 28-3). Cada um dos genes *GAL* é transcrito separadamente, e as células de leveduras não têm óperons como aqueles de bactérias. Entretanto, todos os genes *GAL* apresentam promotores semelhantes e são regulados coordenadamente por um conjunto comum de proteínas. Os promotores dos genes *GAL* consistem na TATA *box* e em sequências Inr, bem como de uma sequência ativadora a montante ($UAS_G$) reconhecida pela proteína ativadora de transcrição Gal4 (Gal4p). A regulação da expressão gênica pela galactose envolve uma ação recíproca entre a Gal4p e duas outras proteínas, Gal80p e Gal3p (Figura 28-30). A Gal80p forma um complexo com a Gal4p, impedindo a Gal4p de funcionar como um ativador dos promotores *GAL*. Quando a galactose está presente, ela se liga à Gal3p, que então interage com o complexo Gal80p-Gal4p, permitindo que a Gal4p funcione como ativador nos vários promotores de *GAL*. À medida que os vários genes de galactose são induzidos e seus produtos se acumulam, a Gal3p pode ser substituída por Gal1p (galactocinase necessária para o metabolismo da galactose que também funciona na regulação) para ativação contínua do circuito regulatório.

Outros complexos proteicos também desempenham papéis na ativação da transcrição dos genes *GAL*. Esses incluem o complexo SAGA para acetilação de histonas e remodelação da cromatina, o complexo SWI/SNF para remodelação da cromatina e o complexo Mediador. A proteína Gal4 é responsável pelo recrutamento desses fatores adicionais necessários para a ativação da transcrição. O SAGA pode ser o primeiro e principal alvo de recrutamento para Gal4p.

A glicose é a fonte de carbono preferida para leveduras, assim como para as bactérias. Quando a glicose está presente, a maioria dos genes *GAL* estando reprimida – esteja presente a galactose ou não. O sistema regulatório *GAL* descrito acima é efetivamente substituído por um complexo sistema de repressão de catabólitos que inclui várias proteínas (não mostrado na Figura 28-30).

## Ativadores da transcrição têm estrutura modular

Em geral, ativadores de transcrição têm um domínio estrutural distinto para a ligação específica do DNA e um ou mais domínios adicionais para ativação da transcrição ou para interação com outras proteínas regulatórias. A interação de duas proteínas regulatórias é frequentemente mediada por domínios contendo zíperes de leucina (Figura 28-14) ou motivos hélice-alça-hélice (Figura 28-15). Aqui são abordados três tipos distintos de domínios estruturais usados na ativação por ativadores de transcrição (**Figura 28-31a**): Gal4p, Sp1 e CTF1.

A Gal4p contém uma estrutura semelhante a um dedo de zinco no seu domínio de ligação do DNA, perto da terminação amino; esse domínio tem seis resíduos Cys que coordenam $Zn^{2+}$. A proteína funciona como homodímero (com a dimerização mediada pelas interações entre duas espirais espiraladas) e se liga à UASG, sequência palindrômica de DNA de cerca de 17 pb de comprimento. A Gal4p tem um domínio de ativação separado com muitos resíduos de aminoácidos ácidos. Experimentos que substituem uma variedade de diferentes sequências peptídicas pelo **domínio de ativação ácido** da Gal4p sugerem que a natureza ácida desse domínio seja fundamental para seu funcionamento, embora sua sequência precisa de aminoácidos possa variar consideravelmente.

O Sp1 ($M_r$ 80.000) é um ativador de transcrição para um grande número de genes nos eucariotos superiores. Seu sítio de ligação de DNA, a caixa GC (sequência consenso GGG-CGG), está geralmente muito perto da TATA *box*. O domínio de ligação de DNA da proteína Sp1 está próximo da extremi-

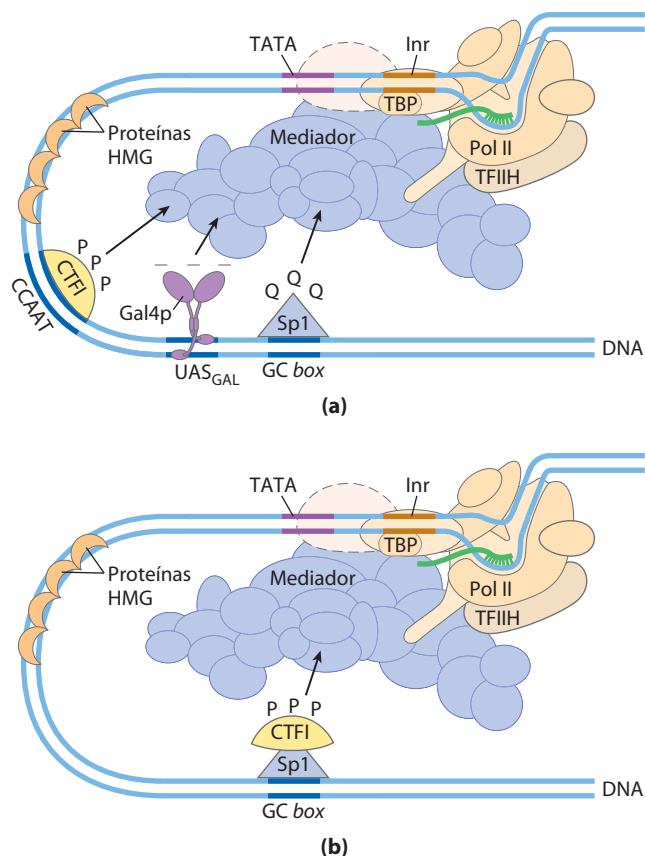



**FIGURA 28-31 Ativadores de transcrição. (a)** Ativadores típicos como CTF1, Gal4p e Sp1 têm um domínio de ligação de DNA e um domínio de ativação. A natureza do domínio de ativação é indicada por símbolos: – – –, acídico; Q Q Q, rico em glutamina; P P P, rico em prolina. Essas proteínas geralmente ativam a transcrição ao interagir com complexos coativadores tais como o Mediador. Observe que os sítios de ligação aqui ilustrados não são geralmente encontrados juntos perto de um único gene. **(b)** Uma proteína quimérica contendo o domínio de ligação de DNA de Sp1 e o domínio de ativação de CTF1 ativa a transcrição se uma caixa GC está presente.

dade C-terminal e contém três dedos de zinco. Dois outros domínios na Sp1 funcionam na ativação e são notáveis pelo fato de 25% dos seus resíduos de aminoácidos serem Gln. Uma ampla variedade de outras proteínas ativadoras também apresenta esses **domínios ricos em glutamina**.

O CTF1 (fator de transcrição 1 ligado a CCAAT) pertence a uma família de ativadores de transcrição que se ligam a uma sequência chamada de sítio CCAAT (sua sequência consenso é TGGN$_6$GCCAA, em que N é qualquer nucleotídeo). O domínio de ligação de DNA do CTF1 contém muitos resíduos de aminoácidos básicos, e a região de ligação é provavelmente disposta como uma hélice $\alpha$. Essa proteína não apresenta nem um motivo hélice-volta-hélice nem um motivo dedo de zinco; seu mecanismo de ligação de DNA ainda não é claro. O CTF1 tem um **domínio de ativação rico em prolina**, com a Pro sendo responsável por mais de 20% dos resíduos de aminoácidos.

A ativação distinta e os domínios de ligação do DNA das proteínas regulatórias muitas vezes atuam de modo completamente independente, como foi demonstrado em experimentos de "troca de domínios". Técnicas de engenharia genética (Capítulo 9) podem unir o domínio de ativação rico em prolina do CTF1 ao domínio de ligação de DNA do Sp1 para criar uma proteína que, como o Sp1 intacto, se liga a caixas GC no DNA e ativa a transcrição em um promotor próximo (como na Figura 28-31b). O domínio de ligação de DNA da Gal4p foi da mesma forma substituído experimentalmente pelo domínio de ligação de DNA do repressor LexA de *E. coli* (da resposta SOS; Figura 28-20). Essa proteína quimérica não se liga no UAS$_G$ nem ativa os genes *GAL* de leveduras (como o faria a Gal4p intacta) a menos que a sequência UAS$_G$ no DNA seja substituída pelo sítio de reconhecimento de LexA.

## A expressão gênica eucariótica pode ser regulada por sinais intercelulares e intracelulares

Os efeitos de hormônios esteroides (e dos hormônios da tireoide e retinoide, que têm modo de ação semelhante) fornecem exemplos adicionais bem conhecidos de modulação de proteínas regulatórias de eucariotos pela interação direta com sinais moleculares (ver Figura 12-30). Ao contrário de outros tipos de hormônios, os hormônios esteroides não precisam se ligar a receptores de membrana plasmática. Em vez disso, eles interagem com receptores intracelulares que são eles próprios ativadores de transcrição. Hormônios esteroides (p. ex., estrogênio, progesterona e cortisol) hidrofóbicos demais para se dissolverem prontamente no sangue são transportados por proteínas carreadoras específicas do seu ponto de liberação a seus tecido-alvo. Neles, o hormônio passa através da membrana plasmática por difusão simples. Uma vez no interior da célula, os hormônios interagem com um de dois tipos de receptor nuclear de ligação de esteroides (**Figura 28-32**). Em ambos os casos, o complexo hormônio-receptor atua ligando-se a sequências de DNA altamente específicas chamadas de **elementos de resposta hormonal** (**HRE**), alterando desse modo a expressão gênica. Atuando nesses sítios, os receptores atuam como ativadores de transcrição, recrutando coativadores e a DNA-polimerase II (junto com seus fatores de transcrição associados) para disparar a transcrição do gene.

As sequências de DNA (HRE) às quais os complexos receptores de hormônios se ligam são semelhantes em comprimento e arranjo, mas diferem em sequência, para os diversos hormônios esteroides. Cada receptor tem uma sequência consenso HRE (Tabela 28-4) à qual o complexo hormônio-receptor se liga bem, com cada consenso consistindo em duas sequências de seis nucleotídeos, contíguos ou separados por três nucleotídeos, em tandem ou em arranjo de palíndromo. Os receptores hormonais têm um domínio de ligação de DNA altamente conservado com dois dedos de zinco (**Figura 28-33**). O complexo hormônio-receptor se liga ao DNA como um dímero, com os domínios dedo de zinco de cada monômero reconhecendo uma das sequências de seis nucleotídeos. A capacidade de um determinado hormônio agir por meio de um complexo hormônio-receptor para alterar a expressão de um gene específico depende da sequência exata do HRE, de sua posição relativa no gene e do número de HRE associados ao gene.

A região de ligação do ligante da proteína receptora – sempre na terminação carboxila – é muito específica de cada receptor específico. Na região de ligação do ligante,

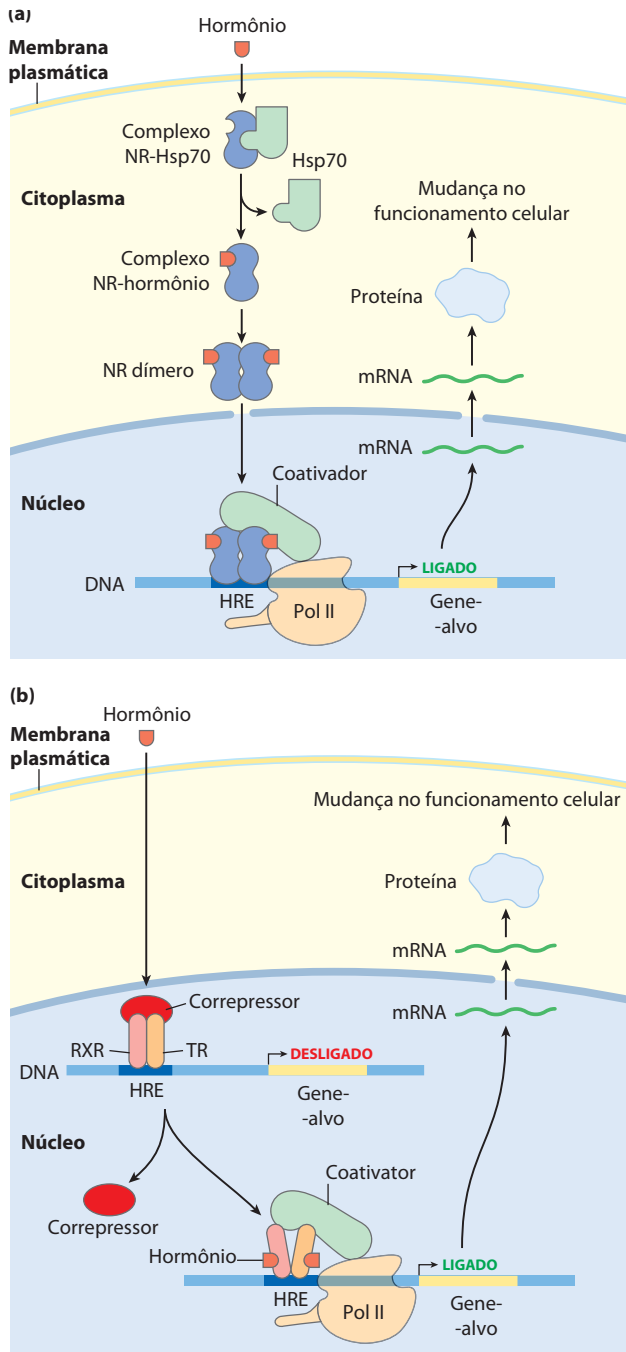



**FIGURA 28-32 Mecanismos de funcionamento do receptor do hormônio esteroide.** Há dois tipos de receptores nucleares ligadores de esteroides. **(a)** Os receptores monoméricos tipo I (NR) são encontrados no citoplasma, em um complexo com uma proteína de choque térmico (Hsp70). Receptores para estrogênio, progesterona, androgênios e glicocorticoides são desse tipo. Quando o hormônio esteroide se liga, Hsp70 se dissocia e o receptor dimeriza, expondo um sinal de localização nuclear. O receptor dimérico, com o hormônio ligado, migra para o núcleo, onde se liga a um elemento de resposta hormonal (HRE) e atua como ativador de transcrição. **(b)** Receptores tipo II, ao contrário, estão sempre no núcleo, ligados a um HRE no DNA e a um correpressor que lhes torna inativos. O receptor do hormônio da tireoide (TR) é desse tipo. O hormônio migra pelo citoplasma e se difunde através da membrana nuclear. No núcleo ele se liga a um heterodímero consistindo no receptor do hormônio da tireoide e do receptor retinoide X (RXR). Uma mudança na sua conformação leva à dissociação do correpressor e o receptor então funciona como ativador de transcrição.

**TABELA 28-4** Elementos de resposta a hormônio (HRE) ligados por receptores de hormônios do tipo esteroide

| Receptor | Sequência consenso a que se liga* |
|---|---|
| Androgênio | GG(A/T)ACAN$_2$TGTTCT |
| Glicocorticoide | GGTACAN$_3$TGTTCT |
| Ácido retinoico (alguns) | AGGTCAN$_5$AGGTCA |
| Vitamina D | AGGTCAN$_3$AGGTCA |
| Hormônio da tireoide | AGGTCAN$_3$AGGTCA |
| RX† | AGGTCANAGGTCANAG GTCANAGGTCA |

* N representa qualquer nucleotídeo.
† Forma um dímero com o receptor do ácido retinoico ou com o receptor da vitamina D.

o receptor glicocorticoide é apenas 30% semelhante ao receptor de estrogênio e 17% semelhante ao receptor do hormônio da tireoide. O tamanho da região de ligação do ligante varia drasticamente; no receptor da vitamina D ela tem apenas 25 resíduos de aminoácidos, enquanto no receptor mineralocorticoide ela tem 603 resíduos. Mutações que alteram um aminoácido nessas regiões podem resultar em perda de resposta a um hormônio específico. Algumas pessoas incapazes de responder ao cortisol, testosterona, vitamina D ou tireoxina têm mutações desse tipo.

Alguns receptores hormonais, incluindo o receptor de progesterona humano, ativam a transcrição com a ajuda de um coativador raro – **ativador de RNA receptor de esteroides** (**SRA**), um RNA de ~700 nucleotídeos. O SRA atua como parte de um complexo de ribonucleoproteína, mas é o componente de RNA que é necessário para a coativação

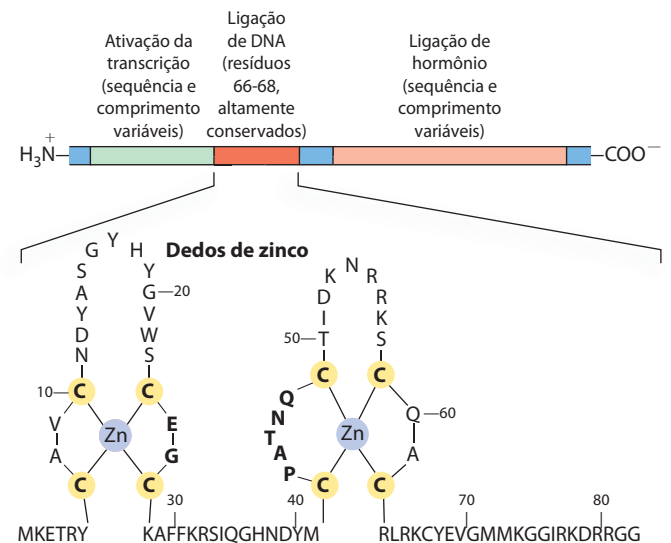



**FIGURA 28-33 Típicos receptores do hormônio esteroide.** Estas proteínas receptoras têm um sítio de ligação para o hormônio, um domínio de ligação de DNA e uma região que ativa a transcrição do gene regulado. O domínio de ligação de DNA altamente conservado tem dois dedos de zinco. A sequência mostrada aqui é a do receptor de estrogênio, mas os resíduos em negrito são comuns a todos os receptores do hormônio esteroide.

da transcrição. O conjunto detalhado de interações entre o SRA e outros componentes dos sistemas regulatórios para esses genes ainda precisa ser elucidado.

## A regulação pode resultar da fosforilação de fatores de transcrição nuclear

Foi observado no Capítulo 12 que os efeitos da insulina na expressão gênica são mediados por uma série de etapas levando, em última análise, à ativação de uma proteína-cinase no núcleo que fosforila proteínas de ligação de DNA específicas, alterando sua habilidade de atuar como fatores de transcrição (ver Figura 12-15). Esse mecanismo geral controla os efeitos de vários hormônios não esteroides. Por exemplo, a via $\beta$ adrenérgica que leva a níveis elevados de cAMP citosólico, que atua como mensageiro secundário em eucariotos, bem como em bactérias (ver Figuras 12-4, 28-17), também afeta a transcrição de um conjunto de genes, cada um dos quais localizado perto de uma sequência de DNA específica chamada de **elemento de resposta de cAMP** (**CRE**). A subunidade catalítica da proteína-cinase A, liberada quando os níveis de cAMP aumentam (ver Figura 12-6), entra no núcleo e fosforila uma proteína nuclear, a **proteína de ligação de CRE** (**CREB**). Quando fosforilada, a CREB se liga aos CRE perto de certos genes e atua como um fator de transcrição, ligando a expressão desses genes.

## Muitos mRNA de eucariotos estão sujeitos à repressão da tradução

A regulação no nível da tradução assume um papel de muito mais destaque em eucariotos do que em bactérias e é observada em uma série de situações celulares. Ao contrário da estreita associação entre transcrição e tradução em bactérias, os transcritos gerados em um núcleo eucariótico devem ser processados e transportados ao citoplasma antes da tradução. Isso pode impor uma demora significativa no aparecimento de uma proteína. É necessário um rápido aumento na produção de proteínas quando um mRNA reprimido na tradução, já presente no citoplasma, pode ser ativado para a tradução sem demora. A regulação da tradução pode desempenhar um papel especialmente importante na regulação de determinados genes muito longos de eucariotos (alguns são medidos em milhões de pares de bases), para os quais a transcrição e o processamento do mRNA podem durar muitas horas. Alguns genes são regulados tanto nos estágios de transcrição como nos de tradução, os últimos desempenhando um papel de ajuste fino nos níveis de proteínas celulares. Em algumas células anucleadas, como reticulócitos (eritrócitos imaturos), o controle da transcrição está inteiramente ausente e o controle da tradução dos mRNA armazenados se torna essencial. Como descrito a seguir, os controles na tradução podem também ter significado espacial durante o desenvolvimento, quando a tradução regulada dos mRNA pré-posicionados cria um gradiente local do produto proteico.

Os eucariotos têm pelo menos quatro mecanismos principais de regulação da tradução.

1. Fatores de iniciação da tradução estão sujeitos à fosforilação por proteínas-cinases. Em geral, as formas fosforiladas são menos ativas e provocam uma diminuição geral da tradução na célula.
2. Algumas proteínas se ligam diretamente ao mRNA e atuam como repressores da tradução, muitos dos quais se ligando a sítios específicos na região 3′ não traduzida (3′UTR). Posicionadas dessa forma, essas proteínas interagem com outros fatores de iniciação de transcrição ligados ao mRNA ou com a subunidade ribossomal 40S para impedir a iniciação da tradução (**Figura 28-34**).
3. Proteínas de ligação, presentes em eucariotos desde leveduras a mamíferos, interrompem a interação entre eIF4E e eIF4G (ver Figura 27-28). As versões dos mamíferos são conhecidas como 4E-BPs (proteínas de ligação eIF4E). Quando o crescimento celular é lento, essas proteínas limitam a tradução ao se ligarem ao local em eIF4E que normalmente interagem com eIF4G. Quando o crescimento celular é retomado ou aumenta em resposta aos fatores de crescimento ou outros estímulos, as proteínas de ligação são inativadas pela fosforilação de proteínas dependentes de cinase.
4. A regulação da expressão gênica mediada por RNA, abordada posteriormente, frequentemente ocorre no nível da repressão da tradução. A variedade de mecanismos de regulação da tradução fornece flexibilidade, permitindo a repressão centrada em alguns poucos mRNA ou regulação global de toda a tradução celular.

**FIGURA 28-34 Regulação da tradução do mRNA eucariótico.** Um dos mecanismos mais importantes para a regulação da tradução em eucariotos envolve a ligação de repressores da tradução (proteínas de ligação de RNA) a sítios específicos na região 3′ não traduzida (3′ UTR) do mRNA. Essas proteínas interagem com os fatores de iniciação eucarióticos ou com o ribossomo para impedir ou tornar mais lenta a tradução.

A regulação da tradução foi particularmente bem estudada em reticulócitos. Um mecanismo em tais células envolve o eIF2, o fator de iniciação que se liga ao tRNA iniciador e o transporta até o ribossomo; quando o Met-tRNA se liga ao sítio P, o fator eIF2B se liga ao eIF2, reciclando-o com a ajuda da ligação de GTP e sua hidrólise. A maturação dos reticulócitos inclui a destruição do núcleo celular, deixando para trás uma membrana plasmática carregada de hemoglobina. Os RNA mensageiros depositados no citoplasma antes

da perda do núcleo permitem a reposição de hemoglobina. Quando os reticulócitos se tornam deficientes em ferro ou grupos heme, a tradução de mRNA de globina é reprimida. Uma proteína-cinase chamada **HCR** (**repressor controlado por hemina**) é ativada, catalisando a fosforilação do eIF2. Quando fosforilado, o eIF2 forma um complexo estável com o eIF2B que sequestra o eIF2, tornando-o indisponível para participar da tradução. Desse modo, o reticulócito coordena a síntese de globina com a disponibilidade de grupos heme.

Muitos exemplos adicionais de regulação da tradução foram encontrados em estudos do desenvolvimento de organismos pluricelulares, como discutido com mais detalhe a seguir.

## O silenciamento gênico pós-transcrição é mediado por RNA de interferência

Em eucariotos superiores, incluindo nematódeos, moscas-da-fruta, plantas e mamíferos, uma classe de pequenos RNA chamados de **microRNA** (**miRNA**) está envolvida no silenciamento de vários genes. Em um fenômeno primeiro descrito por Craig Mello e Andrew Fire, os RNA funcionam ao interagirem com mRNA, frequentemente na 3′-UTR, resultando ou na degradação do mRNA ou na inibição da tradução. Em qualquer caso, o mRNA, e, portanto, o gene que o produz, é silenciado. Essa forma de regulação gênica controla o tempo de desenvolvimento em pelo menos alguns organismos. Ela também é usada como um mecanismo de proteção contra vírus de RNA invasores (particularmente importantes em plantas, que não possuem sistema imune) e para controlar a atividade de transposons. Além disso, pequenas moléculas de RNA podem desempenhar um papel importante (mas ainda indefinido) na formação da heterocromatina.

Craig Mello

Andrew Fire

Muitos miRNA estão presentes apenas transitoriamente durante o desenvolvimento, sendo às vezes chamados de **pequenos RNA temporais** (**stRNA**, do inglês *small temporal RNA*). Milhares de diferentes miRNA foram identificados em eucariotos superiores, e eles podem afetar a regulação de um terço dos genes de mamíferos. Eles são transcritos como RNA precursores de cerca de 70 nucleotídeos de comprimento, com sequências complementares internas que formam estruturas em grampo. Detalhes da via para processamento de miRNA foram descritos no Capítulo 26 (ver Figura 26-27). Os precursores são clivados por endonucleases como Drosha e Dicer para formar duplexes curtos de cerca de 20 a 25 nucleotídeos de comprimento. Uma fita de miRNA processado é transferida para o mRNA-alvo (ou para o RNA de um vírus ou transposon), levando à inibição da tradução ou degradação do RNA (**Figura 28-35**). Alguns miRNA se ligam e afetam um único mRNA e, portanto, afetam a expressão de apenas um único gene. Outros interagem com muitos mRNA e assim formam o núcleo mecânico dos regulons que coordenam a expressão de muitos genes.

O mecanismo de regulação gênica tem um lado prático interessante e muito útil. Se um pesquisador introduz em um organismo uma molécula dupla de RNA correspondendo em sequência a praticamente qualquer mRNA, o Dicer quebra o duplex em segmentos pequenos, chamados de **pequenos RNA interferentes** (**siRNA**, do inglês *small interfering RNA*). Esses se ligam ao mRNA e o silenciam (Figura 28-35b). O processo é conhecido como **RNA de interferência** (**RNAi**). Em plantas, praticamente qualquer gene pode ser desligado dessa maneira. Nematódeos ingerem prontamente RNA funcionais inteiros, e simplesmente introduzindo o RNA duplo na dieta do verme se produz uma supressão muito eficiente do gene-alvo. A técnica rapidamente se tornou uma ferramenta importante nos esforços em andamento para estudar o funcionamento de genes, pois ela pode interromper o funcionamento do mesmo sem criar um organismo mutante. O procedimento também pode ser aplicado a humanos. Os siRNA produzidos em laboratório foram usados para bloquear infecções por HIV e vírus da pólio em culturas de células humanas por cerca de uma semana por vez. Progressos rápidos na pesquisa so-

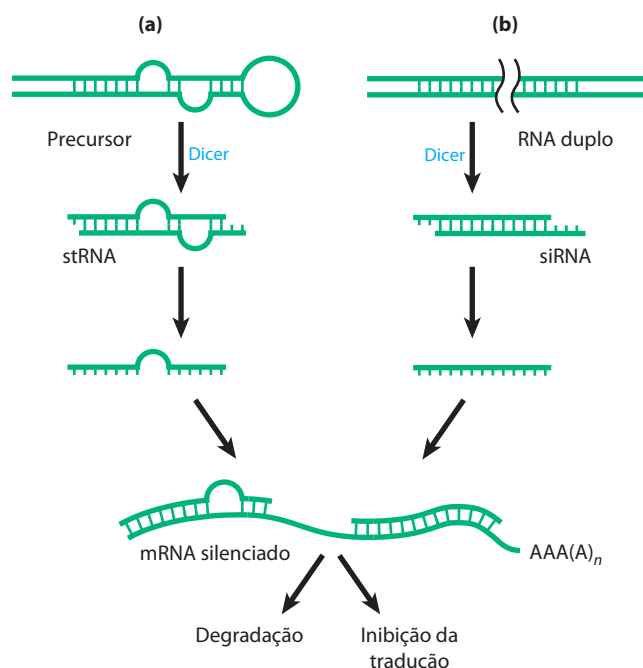



**FIGURA 28-35 Silenciamento gênico por RNA de interferência. (a)** RNA pequenos temporais (stRNA, uma classe de miRNA) são gerados por quebra mediada por Dicer de precursores mais longos que se dobram para criar regiões duplas. Os stRNA então se ligam aos mRNA, levando à degradação de mRNA ou inibição da tradução. **(b)** Os RNA fita dupla podem ser construídos e introduzidos em uma célula. O Dicer processa os RNA duplos em pequenos RNA interferentes (siRNA), que interagem com o mRNA-alvo. Mais uma vez, o mRNA é degradado ou a tradução é inibida.

bre RNA de interferência tornam esse um campo promissor para avanços médicos futuros.

## A regulação da expressão gênica mediada por RNA assume várias formas em eucariotos

Os RNA de função especial em eucariotos incluem os miRNA, descritos acima; os snRNA, envolvidos no *splicing* do RNA (ver Figura 26-16); e os snoRNA, envolvidos na modificação do rRNA (ver Figura 26-25). Todos os RNA que não codificam proteínas, incluindo os rRNA e tRNA, recebem a designação geral de **ncRNA** (RNA não codificadores, do inglês *noncoding RNA*). Os genomas de mamíferos parecem codificar mais RNAnc do que mRNA codificadores (ver Quadro 26-4). De modo não surpreendente, classes funcionais adicionais de RNAnc ainda estão sendo descobertas.

Muitos dos exemplos encontrados recentemente interagem com proteínas em vez de com RNA, e afetam o funcionamento das proteínas ligadas. O SRA que funciona como um coativador dos genes sensíveis ao hormônio esteroide é um exemplo: ele afeta a ativação da transcrição. A resposta de choque térmico em células humanas fornece outro exemplo. O fator de choque térmico 1 (HSF1) é uma proteína ativadora que, em células não estressadas, existe em forma de monômero ligado pela chaperona Hsp90. Sob condições de estresse, o HSF1 é liberado da Hsp90 e trimeriza. O trímero do HSF1 se liga ao DNA e ativa a transcrição de genes cujos produtos são necessários para lidar com o estresse. Um ncRNA chamado HSR1 (RNA de choque térmico 1; ~600 nucleotídeos) estimula a trimerização do HSF1 e a ligação do DNA. O HSR1 não atua sozinho; ele funciona em um complexo com o fator de alongamento da tradução eEF1A.

RNA adicionais afetam a transcrição de várias maneiras. Além do seu papel no *splicing* (ver Figura 26-16), o snRNA U1 se liga diretamente ao fator de transcrição TFIIH. Sua função nesse contexto ainda não está clara, mas ele pode regular o TFIIH ou afetar a associação entre transcrição e *splicing*, ou ambos. Um ncRNA de 331 nucleotídeos chamado 7SK, abundante em mamíferos, se liga ao fator pTEFb de alongamento da transcrição da Pol II (ver Tabela 26-2) e reprime o alongamento do transcrito. Outro ncRNA, B2 (~178 nucleotídeos), se liga diretamente à Pol II durante o choque térmico e reprime a transcrição. A Pol II ligada ao B2 se reúne em PIC estáveis, mas a transcrição é bloqueada. O RNA B2, portanto, interrompe a transcrição de vários genes durante o choque térmico, e o mecanismo que permite que os genes sensíveis a HSF1 se expressem na presença de B2 ainda precisa ser desvendado.

Os papéis reconhecidos desempenhados por ncRNA na expressão gênica e em muitos outros processos celulares estão se expandindo rapidamente. Ao mesmo tempo, o estudo da bioquímica da regulação gênica está se tornando muito menos centrado em proteínas.

## O desenvolvimento é controlado por cascatas de proteínas regulatórias

Em virtude de sua absoluta complexidade e coordenação intricadas, os padrões de regulação gênica que acarretam o desenvolvimento de um zigoto em animais ou plantas pluricelulares não apresentam paralelo. O desenvolvimento preciso de transições na morfologia e na composição de proteínas que dependem de alterações fortemente coordenadas na expressão do genoma. Mais genes são expressos durante o desenvolvimento inicial do que em qualquer outra fase do ciclo de vida. Por exemplo, no ouriço-do-mar, um oócito tem cerca de 18.500 mRNA *diferentes*, comparados com os cerca de 6.000 mRNA diferentes nas células de um tecido diferenciado típico. Os mRNA no oócito dão origem a uma cascata de eventos que regulam a expressão de muitos genes tanto ao longo do tempo quanto do espaço.

Vários organismos emergiram como sistemas modelo importantes para o estudo do desenvolvimento, porque são fáceis de serem mantidos em laboratório e têm tempos de geração relativamente curtos. Eles incluem nematódeos, moscas-da-fruta, peixes-zebra, camundongos e a planta *Arabidopsis.* Essa discussão se concentra no desenvolvimento da mosca-da-fruta. Nossa compreensão dos eventos moleculares durante o desenvolvimento de *Drosophila melanogaster* está particularmente avançada e pode ser usada para ilustrar padrões e princípios de significado geral.

O ciclo de vida da mosca-da-fruta inclui a metamorfose completa durante sua progressão de um embrião para

**FIGURA 28-36 Ciclo de vida da mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster*.** A *Drosophila* passa por metamorfose completa, ou seja, a forma do inseto adulto é radicalmente diferente daquelas dos seus estágios imaturos, uma transformação que precisa de alterações extensas durante o desenvolvimento. Ao final do estágio embrionário, os segmentos se formaram, cada um contendo estruturas especializadas a partir das quais se desenvolverão os vários apêndices e outras características da mosca adulta.

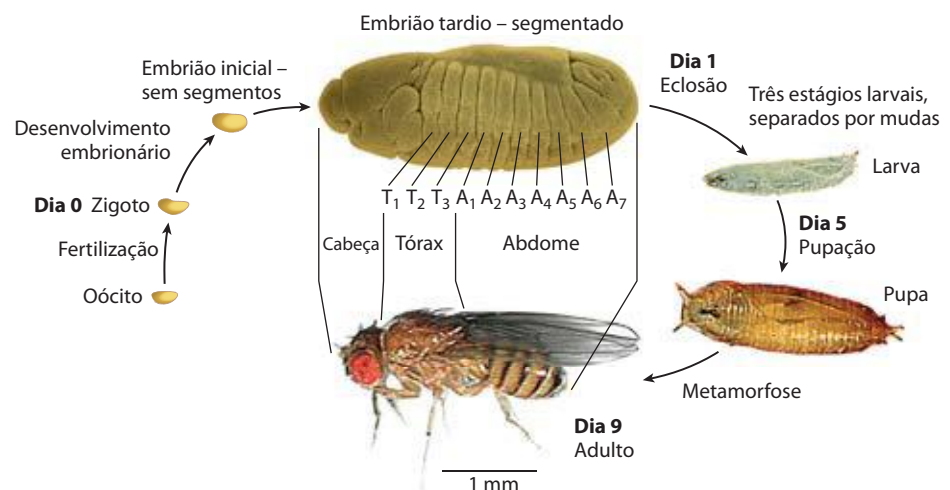
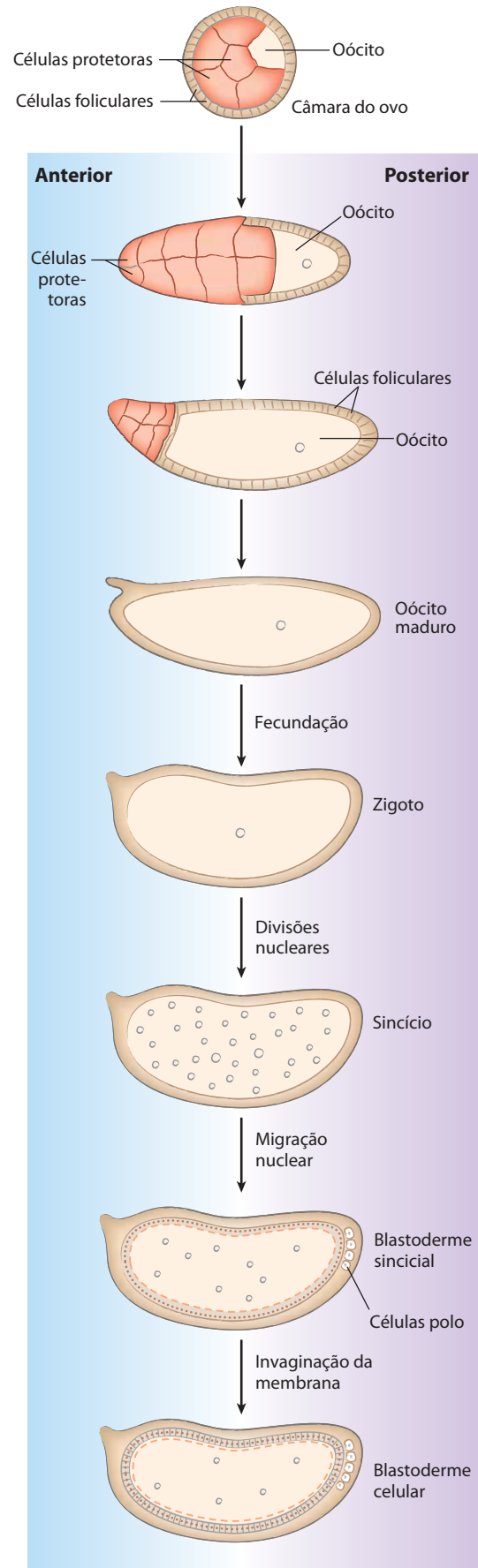



**FIGURA 28-37 Desenvolvimento inicial em *Drosophila*.** Durante o desenvolvimento do ovo, os mRNA maternos (incluindo os transcritos dos genes *bicoid* e *nanos*, discutidos no texto) e as proteínas são depositadas no oócito em desenvolvimento (célula ovo não fecundada) por células protetoras e foliculares. Após a fecundação, os dois núcleos do ovo fecundado se dividem em sincronia no interior do citoplasma comum (sincício), migrando então para a periferia. Invaginações de membrana envolvem os núcleos para criar uma monocamada de células na periferia; esse é o estágio de blastoderme celular. Durante as divisões nucleares iniciais, vários núcleos na extremidade posterior se tornam células polo, que mais tarde se tornam células da linhagem germinativa.

um adulto (**Figura 28-36**). Entre as características mais importantes do embrião estão sua **polaridade** (as partes anteriores e posteriores do animal são prontamente reconhecidas, bem como suas partes dorsal e ventral) e sua **metameria** (o corpo do embrião é composto por segmentos repetidos em série, cada um deles com traços característicos). Durante o desenvolvimento, esses segmentos se organizam em cabeça, tórax e abdome. Cada segmento do tórax do adulto tem um conjunto diferente de apêndices. O desenvolvimento desse padrão complexo está sob controle genético e foram descobertos vários genes reguladores de padrões que afetam drasticamente a organização do corpo.

O ovo de *Drosophila*, junto com 15 células protetoras, é circundado por uma camada de células foliculares (**Figura 28-37**). À medida que a célula ovo se forma (antes da fecundação), os mRNA e proteínas que se originam das células protetoras e foliculares são depositados no interior da célula-ovo, onde alguns deles desempenham um papel crítico no desenvolvimento. Assim que um óvulo fecundado é depositado, seu núcleo se divide e seus núcleos descendentes continuam a se dividir em sincronia a cada 6 a 10 minutos. Membranas plasmáticas não se formam em torno dos núcleos, distribuídos no interior do citoplasma do ovo (formando um sincício). Entre a oitava e nona rodadas da divisão nuclear, os núcleos migram para a camada externa do ovo, formando uma monocamada de núcleos envolvendo o citoplasma comum rico em vitelo; trata-se da sincício blastoderme. Após algumas divisões adicionais, as invaginações de membrana envolvem os núcleos para criar uma camada de células que formam uma blastoderme celular. Nesse estágio, os ciclos mitóticos nas várias células perdem sua sincronia. O destino do desenvolvimento das células é determinado pelos mRNA e proteínas originalmente depositados no ovo pelas células protetoras e foliculares.

As proteínas que, por meio de alterações na concentração local ou atividade, fazem o tecido circundante adotar um formato ou estrutura particular, são algumas vezes chamadas de **morfógenos**; elas são os produtos de genes reguladores de padrões. Como definido por Christiane Nüsslein-Volhard, Edward B. Lewis e Eric F. Wieschaus, três classes principais de genes reguladores de padrão – genes maternos, de segmentação e homeóticos – funcionam em estágios sucessivos do desenvolvimento para especificar as carac-

Christiane Nüsslein-Volhard

Edward B. Lewis, 1918–2004

Eric F. Wieschaus

terísticas básicas do corpo do embrião de *Drosophila*. Os **genes maternos** são expressos no óvulo não fertilizado e os **mRNA maternos** resultantes permanecem dormentes até a fertilização. Eles fornecem a maioria das proteínas necessárias bem no início do desenvolvimento, até que a blastoderme celular esteja formada. Algumas das proteínas codificadas por mRNA maternos dirigem a organização espacial do embrião em desenvolvimento nos estágios iniciais, estabelecendo sua polaridade. Os **genes de segmentação**, transcritos após a fecundação, orientam a formação do número adequado de segmentos corporais. Pelo menos três classes de genes de segmentação atuam em estágios sucessivos: os **genes gap** dividem o embrião em desenvolvimento em várias regiões grandes e os **genes *pair-rule***, junto com os **genes da polaridade do segmento**, definem 14 listras que se tornam os 14 segmentos de um embrião normal. Os **genes homeóticos** são expressos ainda mais tarde; eles especificam quais órgãos e apêndices irão se desenvolver em segmentos corporais específicos.

Os vários genes regulatórios nessas três classes orientam o desenvolvimento da mosca adulta, com cabeça, tórax e abdome, com o número adequado de segmentos, e com os apêndices corretos em cada segmento. Embora a embriogênese leve cerca de um dia para se completar, todos esses genes são ativados durante as primeiras quatro horas. Alguns mRNA e proteínas estão presentes por apenas alguns minutos em pontos específicos durante esse período. Alguns dos genes codificam fatores de transcrição que afetam a expressão de outros genes em um tipo de cascata de desenvolvimento. Também ocorre regulação no nível da tradução e muitos dos genes reguladores codificam repressores de tradução, a maioria dos quais se liga à 3′-UTR do mRNA (Figura 28-34). Como muitos mRNA são depositados no ovo muito antes de sua tradução ser necessária, a repressão da tradução fornece uma ampla via especialmente importante para a regulação em vias de desenvolvimento.

**Genes maternos** Alguns genes maternos são expressos no interior das células protetoras e foliculares e alguns no próprio ovo. No óvulo não fertilizado de *Drosophila*, os produtos dos genes maternos estabelecem dois eixos – anteroposterior e dorsoventral – e assim definem quais regiões do ovo radialmente simétrico se desenvolverão na cabeça e abdome e na parte de cima e de baixo da mosca adulta. Se todas as células se dividissem para produzir duas células-filhas idênticas, os organismos pluricelulares nunca seriam mais do que uma bola de células idênticas. A produção de diferentes destinos celulares necessita de divisões celulares assimétricas programadas. Um evento chave no desenvolvimento inicial é o estabelecimento de gradientes de RNA e proteínas ao longo dos eixos corporais. Alguns mRNA maternos têm produtos proteicos que se difundem através do citoplasma para criar uma distribuição assimétrica no ovo. Portanto, diferentes células na blastoderme celular herdam diferentes quantidades dessas proteínas, colocando as células em diferentes vias de desenvolvimento. Os produtos dos mRNA maternos incluem ativadores ou repressores de transcrição, bem como repressores de tradução, todos regulando a expressão de outros genes reguladores de padrão. Os padrões resultantes específicos e sequências de expressão gênica diferem, portanto, entre diferentes linhagens celulares, em última análise orquestrando o desenvolvimento de cada estrutura do adulto.

O eixo anteroposterior em *Drosophila* é definido pelo menos em parte pelos produtos dos genes *bicoid* e *nanos*. O produto do gene *bicoid* é um importante morfógeno anterior e o produto do gene *nanos* é um importante morfógeno posterior. O mRNA do gene *bicoid* é sintetizado pelas células protetoras e depositado no ovo não fertilizado perto do seu polo anterior. Nüsslein-Volhard descobriu que esse mRNA é traduzido logo após a fecundação, e a proteína Bicoid se difunde através da célula para criar, na sétima divisão nuclear, um gradiente de concentração irradiando a partir do polo anterior (**Figura 28-38a**). A proteína Bicoid é um fator de transcrição que ativa a expressão de vários genes de segmentação; a proteína contém um homeodomínio (p. 1163). A Bicoid também é um repressor de tradução que inativa certos mRNA. As quantidades de proteína Bicoid em várias partes do embrião afetam a expressão seguinte de outros genes de uma maneira dependente de limiar. Os genes são ativados por transcrição ou reprimidos por tradução apenas onde a concentração de proteína Bicoid excede o limite. Mudanças na forma do gradiente de concentração de Bicoid apresentam efeitos drásticos no padrão do corpo. A ausência de proteína Bicoid resulta no desenvolvimento de um embrião com dois abdomes, mas sem cabeça ou tórax (Figura 28-38b); entretanto, embriões sem Bicoid irão se desenvolver normalmente se uma quantidade adequada de mRNA *bicoid* for injetada no ovo na extremidade apropriada. O gene *nanos* tem um papel análogo, mas o seu mRNA é depositado na extremidade posterior do ovo e o gradiente anteroposterior de proteína atinge seu pico no polo posterior. A proteína Nanos é um repressor da tradução.

Um olhar mais amplo dos efeitos dos genes maternos revela o esboço de um circuito de desenvolvimento. Além dos mRNA *bicoid* e *nanos*, depositados assimetricamente no ovo, vários outros mRNA maternos são depositados uniformemente no citoplasma do ovo. Três desses mRNA codificam as proteínas Pumilio, Hunchback e Caudal, todas afetadas por *nanos* e *bicoid* (**Figura 28-39**). Caudal e Pumilio estão envolvidas no desenvolvimento da extremidade posterior da mosca. Caudal é uma ativadora da transcrição com um homeodomínio; Pumilio é um repressor de tradução. A proteína Hunchback desempenha um papel importante no desenvolvimento da extremidade anterior e também é um regulador da transcrição de vários genes, em alguns casos

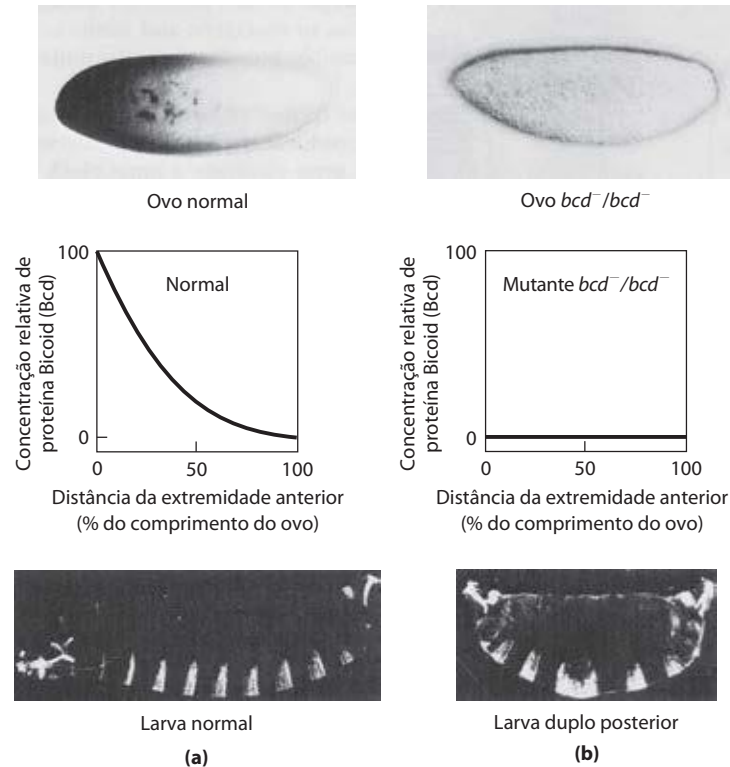



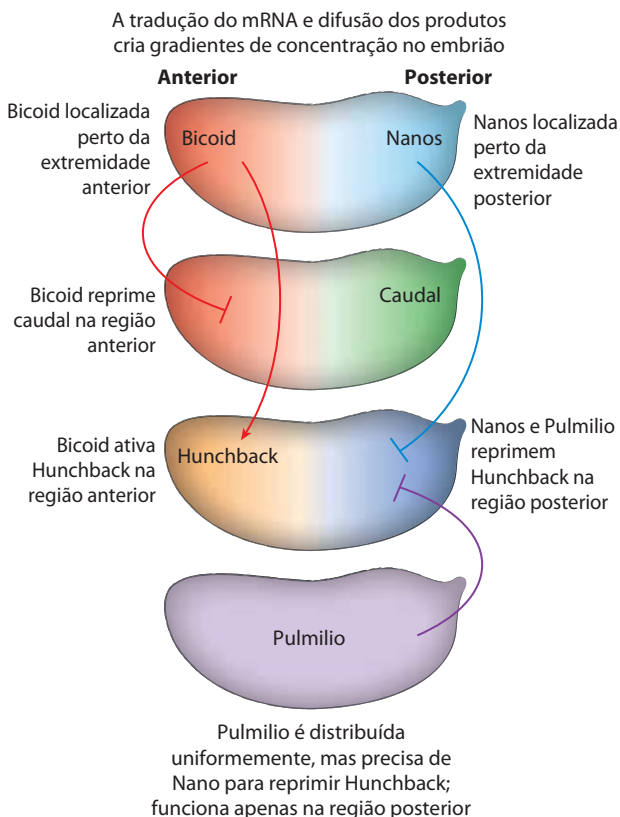
**FIGURA 28-38 Distribuição de um produto do gene materno em um ovo de *Drosophila*.** **(a)** Micrografia de um ovo marcado imunologicamente, mostrando a distribuição do produto do gene *bicoid* (*bcd*). O gráfico mede a intensidade da marcação. Essa distribuição é essencial para o desenvolvimento normal das estruturas anteriores. **(b)** Se o gene *bcd* não for expresso pela mãe (mutante $bcd^-/bcd^-$) e, portanto, nenhum mRNA *bicoid* for depositado no ovo, o embrião resultante tem duas regiões posteriores (e logo morre).

um regulador positivo, em outros casos, negativo. A Bicoid suprime a tradução de *caudal* na extremidade anterior e também atua como ativador da transcrição de *hunchback* na blastoderme celular. Como *hunchback* é expresso tanto a partir de mRNA quanto de genes no ovo em desenvolvimento, ele é considerado tanto um gene materno quanto um gene de segmentação. O resultado das atividades de Bicoid é um aumento da concentração de Hunchback na extremidade anterior do ovo. As proteínas Nanos e Pumilio atuam como repressores de tradução de *hunchback*, suprimindo a síntese de sua proteína próximo da extremidade posterior do ovo. Pumilio não funciona na ausência da proteína Nanos, e o gradiente da expressão de Nanos confina a atividade de ambas as proteínas à região posterior. A repressão da tradução do gene *hunchback* leva à degradação do mRNA de *hunchback* perto da extremidade posterior. Entretanto, a ausência de Bicoid na extremidade posterior

**FIGURA 28-39 Circuitos regulatórios do eixo anteroposterior em um ovo de *Drosophila*.** Os mRNA *bicoid e nanos* estão localizados perto dos polos anterior e posterior, respectivamente. Os mRNA *caudal*, *hunchback* e *pumilio* estão distribuídos uniformemente por todo o citoplasma do ovo. Os gradientes das proteínas Bicoid (Bcd) e Nanos afetam a expressão dos mRNA *caudal* e *hunchback* como mostrado, levando à acumulação da proteína Hunchback na região anterior e de proteína Caudal na região posterior do ovo. Como a proteína Pumilio precisa da proteína Nanos para sua atividade como um repressor da tradução de *hunchback*, ela funciona apenas na extremidade posterior.

leva à expressão de *caudal*. Desse modo, as proteínas Hunchback e Caudal se tornam distribuídas assimetricamente distribuídas no ovo.

**Genes de segmentação** Genes gap, genes *pair-rule* e genes de polaridade de segmentos, três subclasses de genes de segmentação em *Drosophila*, são ativados em estágios sucessivos do desenvolvimento embrionário. A expressão dos genes gap é geralmente regulada pelos produtos de um ou mais genes maternos. Pelo menos alguns dos genes gap codificam fatores de transcrição que afetam a expressão de outros genes de segmentação ou (posteriormente) genes homeóticos.

Um gene de segmentação bem caracterizado é *fushi tarazu* (*ftz*), da subclasse *pair-rule*. Quando *ftz* é deletado, o embrião desenvolve 7 segmentos em vez dos 14 normais, cada segmento duas vezes a largura normal. A proteína Fushi-tarazu (Ftz) é um ativador de transcrição com um homeodomínio. Os mRNA e proteínas derivadas do gene *ftz* normal acumulam em um padrão impressionante de sete listras que envolvem os dois terços posteriores do embrião (**Figura 28-40**). As listras demarcam as posições de segmentos que se desenvolvem mais tarde; esses segmentos são eliminados se o funcionamento da *ftz* é perdido. A proteína Ftz e algumas poucas proteínas regulatórias similares regulam direta ou indiretamente a expressão de um grande número de genes na cascata de desenvolvimento contínua.

**Genes homeóticos** Um conjunto de 8 a 11 genes homeóticos dirige a formação de estruturas particulares em locais específicos no plano corporal. Esses genes são agora mais comumente chamados de **genes *Hox***, termo derivado de "*homeobox*", a sequência gênica conservada que codifica o homeodomínio e está presente em todos esses genes. Apesar do nome, essas não são as únicas proteínas relacionadas ao desenvolvimento que incluem um homeodomínio (p. ex., o produto do gene *bicoid* descrito acima tem um homeodomínio), e "Hox" é mais uma classificação funcional do que estrutural. Os genes *Hox* estão organizados em grupos genômicos. *Drosophila* tem um desses grupos e os mamíferos têm quatro (**Figura 28-41**). Os genes nesses grupos são notavelmente semelhantes de nematódeos ao homem. Em *Drosophila*, cada um dos genes *Hox* é expresso em um segmento particular do embrião e controla o desenvolvimento da parte cor-

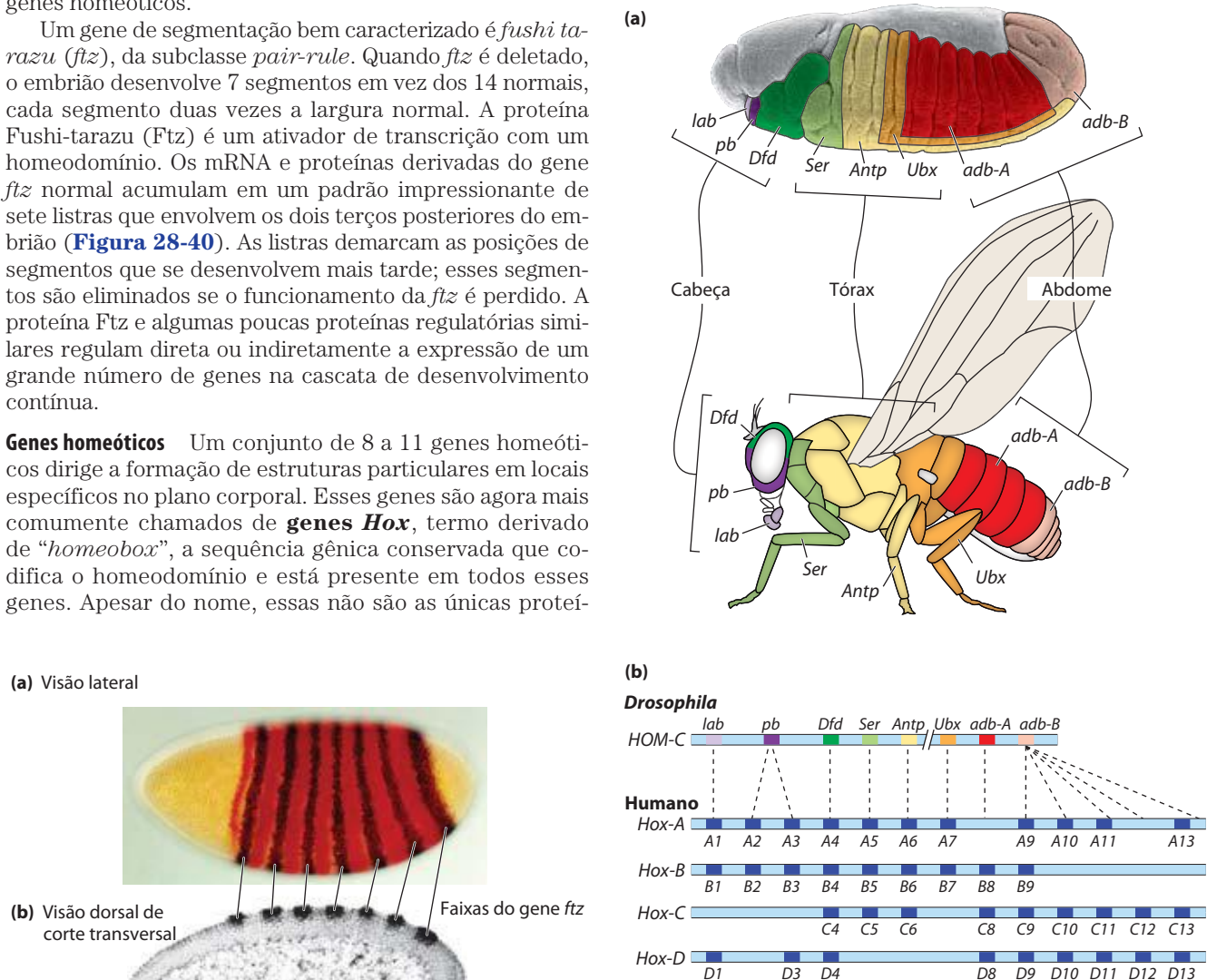



**FIGURA 28-40 Distribuição do produto do gene *fushi-tarazu* (*ftz*) em embriões iniciais de *Drosophila*.** **(a)** Empregando uma metodologia de marcação gene-específica, o produto gênico pode ser detectado em sete bandas em torno da circunferência do embrião. Essas bandas **(b)** aparecem como pontos escuros (geradas por um marcador radioativo) em uma autorradiografia de secção transversal e demarcam as margens anteriores dos segmentos que aparecerão no embrião tardio.

**FIGURA 28-41 Os grupos de genes *Hox* e seus efeitos no desenvolvimento.** **(a)** Cada gene *Hox* na mosca-da-fruta é responsável pelo desenvolvimento de estruturas em uma parte definida do corpo e é expressa em regiões definidas do embrião, como mostrado aqui com códigos de cores. **(b)** *Drosophila* tem um grupo de genes *Hox*; o genoma humano tem quatro. Muitos desses genes são altamente conservados em animais pluricelulares. Relações evolutivas, indicadas pelos alinhamentos de sequência entre o grupo de genes *Hox* em *Drosophila* e aqueles nos grupos de genes *Hox* em mamíferos, são mostradas por linhas tracejadas. Relações semelhantes entre quatro conjuntos de genes *Hox* de mamíferos são indicadas por alinhamento vertical.

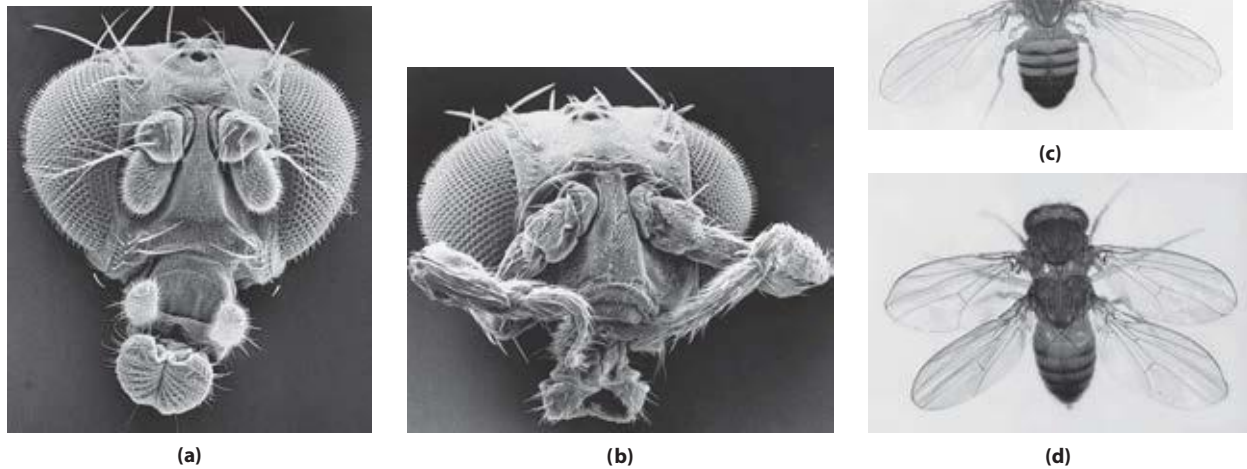



**FIGURA 28-42 Efeitos de mutações nos genes Hox em *Drosophila*. (a)** Cabeça normal. **(b)** Mutante homeótico (*antennapedia*) em que as antenas são substituídas por patas. **(c)** Estrutura corporal normal. **(d)** Mutante homeótico (*bithorax*) em que um segmento se desenvolveu incorretamente para produzir um conjunto extra de asas.

respondente da mosca adulta. A terminologia usada para descrever os genes *Hox* pode ser confusa. Eles têm nomes históricos na mosca-da-fruta (p. ex., *ultrabithorax*), enquanto em mamíferos são designados por dois sistemas concorrentes com base em grupos de letras (A, B, C, D) ou números (1, 2, 3, 4).

A perda dos genes *Hox* em moscas-da-fruta por mutação ou deleção provoca o aparecimento de um apêndice normal ou estrutura corporal em uma posição corporal inadequada. Um exemplo importante é o gene *ultrabithorax* (*ubx*). Quando o funcionamento de Ubx é perdido, o primeiro segmento abdominal se desenvolve incorretamente, tendo a estrutura do terceiro segmento torácico. Outras mutações homeóticas conhecidas provocam a formação de um conjunto extra de asas, ou duas patas na posição da cabeça em que antenas são normalmente encontradas (**Figura 28-42**). Geralmente os genes *Hox* abrangem longas regiões do DNA. O gene *ubx*, por exemplo, tem 77.000 pb de comprimento. Mais de 73.000 pb desse gene são íntrons, um dos quais tem mais de 50.000 pb de comprimento. A transcrição do gene *ubx* leva aproximadamente uma hora. Acredita-se que o atraso que isso impõe à expressão gênica de *ubx* seja um mecanismo de tempo envolvido na regulação temporal das etapas seguintes do desenvolvimento. Muitos genes *Hox* são regulados adicionalmente por miRNA codificados por regiões intergênicas de grupos de genes *Hox*. Todos os produtos de genes *Hox* são em si fatores de transcrição que regulam a expressão de uma série de genes situados a jusante. A identificação desses alvos situados a jusante está em andamento.

Muitos dos princípios de desenvolvimento destacados anteriormente se aplicam a outros eucariotos, de nematódeos a humanos. Algumas das proteínas reguladoras são conservadas. Por exemplo, os produtos dos genes que contêm homeobox *HOXA7* em camundongos e *antennapedia* em mosca-da-fruta diferem em apenas um resíduo de aminoácido. É claro que, embora os mecanismos regulatórios moleculares possam ser semelhantes, muitos dos eventos finais do desenvolvimento não são conservados (os seres humanos não têm asas ou antenas). Os diferentes resultados são devidos a diferenças nos genes-alvo a jusante controlados pelos genes *Hox*. A descoberta de determinantes estruturais com funções moleculares identificáveis é a primeira etapa na compreensão dos eventos moleculares subjacentes ao desenvolvimento. À medida que mais genes e seus produtos proteicos forem descobertos, o lado bioquímico desse vasto quebra-cabeça será elucidado em detalhes cada vez mais ricos.

## Células-tronco têm potencial de desenvolvimento que pode ser controlado

Entendendo o desenvolvimento e os mecanismos da regulação gênica por trás dele, é possível controlá-lo. Um humano adulto tem muitos tipos de tecidos diferentes. Muitas das células se diferenciam definitivamente e não mais se dividem. Se um órgão funciona defeituosamente em razão de doença ou um membro é perdido em um acidente, os tecidos não são prontamente repostos. A maioria das células não é facilmente reprogramada em virtude dos processos regulatórios em curso ou mesmo devido à perda de parte ou de todo o DNA genômico. A medicina possibilitou a realização de transplantes, mas os doadores de órgãos são uma fonte limitada e a rejeição de órgãos permanece um importante problema médico. Se os seres humanos conseguissem regenerar seus próprios órgãos, membros ou tecido nervoso, a rejeição não seria mais um problema. Curas reais para a falência renal ou distúrbios neurodegenerativos se tornariam realidade.

A chave para a regeneração de tecidos se encontra nas **células-tronco** – células que retiveram a capacidade de se diferenciar em vários tecidos. Em seres humanos, depois que um óvulo é fecundado, as primeiras divisões celulares criam uma bola de células **totipotentes** (a mórula), células com a capacidade de se diferenciar individualmente em qualquer tecido ou mesmo em um organismo completo (**Figura 28-43**). A divisão celular contínua produz uma bola oca, um blastocisto. As células mais externas do blastocisto acabam formando a placenta. As camadas mais internas formam as camadas germinativas do feto em desenvolvimento – o ectoderma, mesoderma e endoderma. Essas células são **pluripotentes**: originam células de todas as três camadas germinativas e se diferenciam em muitos tipos de tecidos. Entretanto, não se diferenciam em um organismo completo. Algumas dessas células são **unipotentes**: desenvolvem-se em apenas um tipo de célula e/ou tecido. São as células pluripotentes do blastocisto, as **células-tronco embrionárias**, atualmente usadas na pesquisa de células-tronco embrionárias.

**FIGURA 28-43 Células-tronco totipotentes e pluripotentes.** As células do estágio de mórula são totipotentes e têm a capacidade de se diferenciar em um organismo completo. A fonte de células-tronco embrionários pluripotentes é a massa interna de células do blastocisto. As células pluripotentes dão origem a vários tipos de tecidos, mas não formam organismos completos.

As células-tronco têm duas funções: repor a si mesmas e, ao mesmo tempo, fornecer células que podem se diferenciar. Essas tarefas são realizadas de muitas maneiras (**Figura 28-44a**). Todas ou parte das células-tronco embrionárias podem, em princípio, estar envolvidas na reposição, diferenciação ou ambos.

Outros tipos de células-tronco têm o potencial de serem usados para fins médicos. No organismo adulto, **células-tronco adultas**, como produtos de diferenciação adicional, têm um potencial mais limitado de desenvolvimento posterior do que as células-tronco embrionárias. Por exemplo, as células-tronco hematopoiéticas da medula óssea podem dar origem a muitos tipos de células sanguíneas e também a células com a capacidade de regenerar ossos. Elas são chamadas de **multipotentes**. Entretanto, essas células não podem se diferenciar em um fígado, rim ou neurônio. Frequentemente se diz que as células-tronco adultas têm um **nicho**, microambiente que promove a manutenção da célula-tronco, enquanto ao mesmo tempo permite a diferenciação de algumas células-filhas como substitutas das células no tecido em que atuam (Figura 28-44b). As células-tronco hematopoiéticas na medula óssea ocupam um nicho em que a sinalização de células vizinhas e outras dicas mantêm a linhagem de células-tronco. Ao mesmo tempo, algumas células-filhas se diferenciam para fornecer as células sanguíneas necessárias. Compreender o nicho em que as células-tronco operam, e os sinais que o nicho fornece, é essencial nos esforços para aproveitar o potencial das células-tronco para a regeneração de tecidos.

Todas as células-tronco têm problemas em relação às aplicações médicas no homem. As células-tronco adultas têm uma capacidade limitada de regenerar tecidos, estão presentes geralmente em número pequeno e são difíceis de serem isoladas de um humano adulto. Células-tronco embrionárias têm um potencial de diferenciação muito maior e podem ser mantidas em meio de cultura para gerar grande número de células. Entretanto, seu uso é acompanhado por preocupações éticas relacionadas à necessária destruição de embriões humanos. A identificação de uma fonte de células-tronco abundante e clinicamente útil, que não suscite preocupações, permanece um objetivo central da pesquisa médica. A capacidade de manter células-tronco em cultura (ou seja, mantê-las em estado indiferenciado) e manipulá-las para crescer e se diferenciar em tecidos particulares resulta, em grande parte, da compreensão da biologia do desenvolvimento. A identificação e a manutenção em cultura de células-tronco pluripotentes de blastocistos humanos foram relatadas

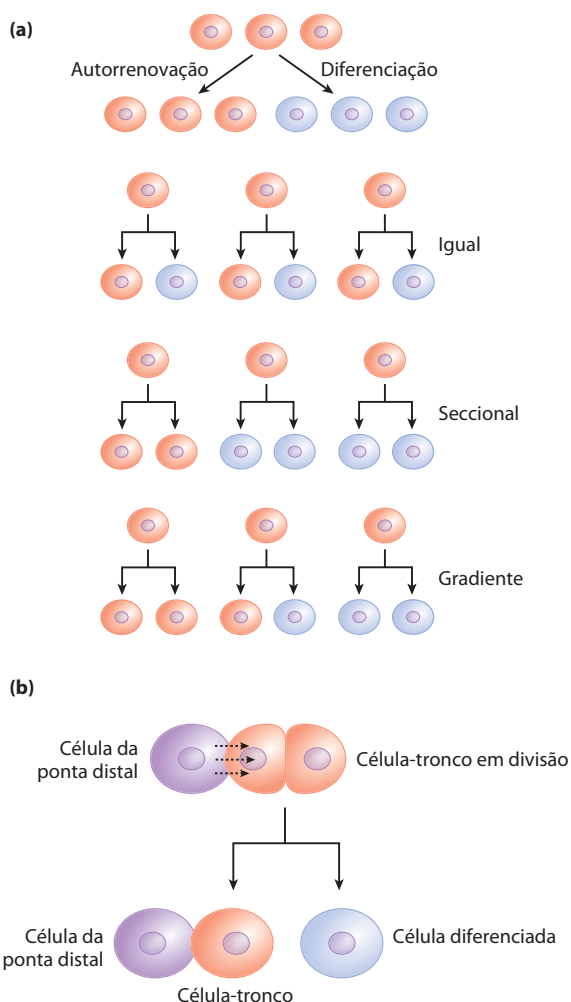



**FIGURA 28-44 A proliferação de células-tronco *versus* diferenciação e desenvolvimento.** As células-tronco devem encontrar um equilíbrio entre autorrenovação e diferenciação. **(a)** Alguns padrões possíveis de divisão celular que permitem o reabastecimento de células-tronco e a produção de algumas células diferenciadas. Cada célula pode produzir uma célula-tronco e uma célula diferenciada, duas células diferenciadas ou duas células-tronco em partes definidas do tecido ou cultura. Ou pode ser estabelecido um gradiente de condições de crescimento, com os destinos das células diferindo de uma extremidade do gradiente para a outra. **(b)** Estabelecendo um nicho de desenvolvimento pelo contato de células-tronco com uma célula ou grupo de células. Sinais moleculares fornecidos pelas células nicho (neste caso, para plantas, uma célula da ponta distal) ajudam a orientar o fuso mitótico para a divisão das células-tronco e asseguram que uma célula-filha retenha as propriedades de célula-tronco.

James Thomson

por James Thomson e colaboradores em 1998. Esse avanço levou à disponibilidade de longo prazo de linhagens celulares consagradas para pesquisa.

Até agora, as células-tronco embrionárias de humanos e camundongos foram usadas na maior parte das pesquisas. Embora ambos os tipos de células-tronco sejam pluripotentes, eles precisam de condições de cultura muito diferentes, otimizadas para permitir a divisão celular indefinidamente sem diferenciação. As células-tronco embrionárias de camundongos crescem em uma camada de gelatina e precisam da presença de um fator de inibição de leucemia (LIF). As células-tronco embrionárias humanas crescem em uma camada de alimentação de fibroblastos embrionários de camundongo e precisam do básico fator de crescimento de fibroblastos (bFGF ou FGF2). O uso de uma camada de alimentação implica que as células de camundongo estejam fornecendo um produto difusível ou algum sinal de superfície, ainda desconhecido, que é necessário para as células-tronco humanas para promover a divisão celular ou impedir a diferenciação.

Um avanço significativo, registrado em 2007, se baseia no sucesso em reverter a diferenciação. De fato, células da pele – primeiro de camundongos, depois de humanos – foram reprogramadas para assumir as características de células-tronco pluripotentes. Com reprogramação e manipulações, as células expressam pelo menos quatro fatores de transcrição (Oct4, Sox2, Nanog e Lin28), todos conhecidos por ajudarem a manter o estado de célula-tronco. Avanços graduais nessa tecnologia podem tornar desnecessário o cultivo de células-tronco embrionárias e fornecer uma fonte de células-tronco geneticamente adequada a um paciente prospectivo.

A discussão sobre a regulação do desenvolvimento e células-tronco nos remete para um início bioquímico – tanto figurativamente quanto literalmente. A evolução fornece apropriadamente a primeira e a última palavra deste livro. Se a evolução deve gerar o tipo de alterações associadas a uma espécie diferente, trata-se do programa de desenvolvimento que deve ser afetado. Os processos de desenvolvimento e evolutivos estão intimamente associados, cada um informando o outro (Quadro 28-1). O estudo contínuo da bioquímica tem tudo a ver com o enriquecimento do futuro da humanidade e a compreensão de nossas origens.

## RESUMO 28.3 Regulação da expressão gênica em eucariotos

- Em eucariotos, a regulação positiva é mais comum do que a regulação negativa e a transcrição é acompanhada por grandes alterações na estrutura da cromatina.
- Em geral, promotores para a Pol II têm uma TATA *box* e sequência Inr, bem como múltiplos sítios de ligação para ativadores de transcrição. Esses últimos sítios, algumas vezes localizados centenas ou milhares de pares de bases distantes da TATA *box*, são chamados de sequências ativadoras a montante em leveduras e potenciadores em eucariotos superiores.
- Grandes complexos de proteínas são geralmente necessários para regular a atividade de transcrição. Os efeitos dos ativadores de transcrição na Pol II são mediados pelos complexos de proteínas coativadoras tais como Mediador. As estruturas modulares dos ativadores têm ativação e domínios de ligação do DNA distintos. Outros complexos proteicos, incluindo as histonas acetiltransferases e complexos dependentes de ATP tais como SWI/SNF e NURF, remodelam reversivamente e modificam a estrutura da cromatina.

## QUADRO 28-1 MÉTODOS Sobre barbatanas, asas, bicos e outras curiosidades

A América do Sul tem várias espécies de tentilhões comedores de sementes, comumente chamados de tizius. Cerca de três milhões de anos atrás, um pequeno grupo de tizius, de uma única espécie, alçou voo da costa continental, no Pacífico. Talvez levados por uma tempestade, eles perderam de vista a terra e viajaram aproximadamente 1.000 km. Pequenos pássaros como esses poderiam ter morrido nessa jornada, mas uma chance ínfima levou esse grupo a uma ilha vulcânica recentemente formada em um arquipélago mais tarde conhecido como Galápagos. Tratava-se de um cenário virgem, com plantas e insetos inexplorados como fontes de alimento, e os tentilhões recém-chegados sobreviveram. Ao longo dos anos, novas ilhas se formaram e foram colonizadas por novas plantas e insetos – e pelos tentilhões. Os pássaros exploraram os novos recursos nas ilhas e grupos de pássaros gradualmente se especializaram e divergiram em novas espécies. Quando Charles Darwin pisou nas ilhas em 1835, havia muitas espécies diferentes de tentilhões nas várias ilhas do arquipélago, se alimentando de sementes, frutos, insetos, pólen ou mesmo sangue.

A diversidade de criaturas vivas foi uma fonte de admiração para o homem muito antes de os cientistas procurarem entender suas origens. A visão extraordinária transmitida por Darwin, inspirada em parte por seu encontro com os tentilhões de Galápagos, forneceu uma explicação ampla para a existência de organismos com diversidade nas aparências e nas características. Ela também deu origem a muitas questões acerca dos mecanismos envolvidos na evolução. Respostas àquelas questões começaram a aparecer, primeiro pelo estudo dos genomas e do metabolismo de ácidos nucleicos na última metade do século vinte e, mais recentemente, por meio do emergente campo apelidado de evo-devo – mistura da biologia evolutiva e biologia do desenvolvimento.

Na sua síntese moderna, a teoria da evolução apresenta dois elementos principais: mutações em uma população geram diversidade genética; a seleção natural então atua nessa diversidade para favorecer os indivíduos com ferramentas genômicas mais úteis e desfavorecer outros. As mutações ocorrem em taxas significativas no genoma de todos os indivíduos, em todas as células (ver Seção 8.3 e Figura 25-20). Mutações vantajosas em organismos unicelulares ou na linhagem germinativa de organismos pluricelulares podem ser herdadas (isto é, passadas para um número maior da sua prole) se elas lhe conferirem uma vantagem. É um esquema simples. Muitos se perguntaram, porém, se isso é suficiente para explicar, por exemplo, os muitos tipos de bicos diferentes nos tentilhões de Galápagos, ou a diversidade de tamanho e forma entre os mamíferos. Até décadas recentes, existiam várias hipóteses amplamente aceitas a respeito do processo evolutivo: que muitas mutações e novos genes seriam necessários para dar origem a uma nova estrutura física; que organismos mais complexos teriam genomas maiores, e que espécies muito diferentes teriam poucos genes em comum. Todas essas hipóteses estavam erradas.

A genômica moderna revelou que o genoma humano contém menos genes do que esperado – não muitos a mais do que o genoma da mosca-da-fruta, e menos do que os genomas de alguns anfíbios. Os genomas de todos os mamíferos, de camundongos a humanos, são surpreendentemente semelhantes em número, tipo e arranjo cromossômico de genes. Enquanto isso, a evo-devo está nos informando como criaturas complexas e muito diferentes podem evoluir a partir dessas realidades genômicas.

Os tipos de organismos mutantes mostrados na Figura 28-42 foram estudados pelo biólogo inglês William Bateson no final do século XIX. Bateson usou suas informações para desafiar a noção darwinista de que as alterações evolutivas teriam que ser graduais. Estudos recentes dos genes que controlam o desenvolvimento de organismos colocaram um ponto de exclamação nas ideias de Bateson. Mudanças sutis nos padrões regulatórios durante o desenvolvimento, refletindo apenas uma ou poucas mutações, podem resultar em mudanças físicas assustadoras, alimentando uma evolução surpreendentemente rápida.

Os tentilhões de Galápagos fornecem um maravilhoso exemplo da ligação entre evolução e desenvolvimento. Há pelo menos 14 (alguns especialistas listam 15) espécies de tentilhões de Galápagos, diferenciadas em grande parte pela estrutura do bico. Os tentilhões do solo, por exemplo, têm bicos lagos e fortes, adaptados a triturar sementes duras e grandes. Os tentilhões dos cactos têm bicos mais finos e longos, ideais para acessar os frutos e flores dos cactos (Figura Q-1). Clifford Tabin e colabo-

- Hormônios afetam a regulação da expressão gênica em uma de duas maneiras. Os hormônios esteroides interagem diretamente com receptores intracelulares que são proteínas regulatórias de ligação de DNA; a ligação do hormônio tem efeitos positivos ou negativos na transcrição dos genes-alvo do hormônio. Hormônios não esteroides se ligam a receptores na superfície das células, disparando uma via de sinalização que pode levar à fosforilação de uma proteína regulatória, afetando sua atividade.
- A regulação mediada por RNA desempenha um importante papel na expressão gênica eucariótica, com a extensão de mecanismos conhecidos aumentando.

radores investigaram extensamente um conjunto de genes expresso durante o desenvolvimento craniofacial de aves. Eles identificaram um único gene, *Bmp4*, cujo nível de expressão se correlacionava com a formação dos bicos mais robustos dos tentilhões de solo. Bicos mais robustos também se formaram em embriões de galinhas quando altos níveis de Bmp4 foram artificialmente expressos nos tecidos apropriados, confirmando a importância de *Bmp4*. Em um estudo semelhante, a formação de bicos longos e finos estava ligada à expressão de calmodulina (ver Figura 12-11) em tecidos específicos em estágios de desenvolvimento apropriados. Assim, mudanças importantes na forma e na função do bico podem ser produzidas por alterações sutis na expressão de apenas dois genes envolvidos na regulação do desenvolvimento. Muito poucas mutações são necessárias e as que ocorrem afetam a regulação. Novos genes *não* são necessários.

O sistema de genes regulatórios que guia o desenvolvimento é surpreendentemente conservado por todos os vertebrados. A expressão elevada de *Bmp4* no tecido adequado, no período certo, leva ao desenvolvimento de partes da mandíbula mais robustas no peixe-zebra. O mesmo gene desempenha um papel essencial no desenvolvimento dos dentes de mamíferos. O desenvolvimento dos olhos é desencadeado pela expressão de um único gene, *Pax6*, em mosca-da-fruta e em mamíferos. O gene *Pax6* de camundongos irá desencadear o desenvolvimento de olhos de mosca-da-fruta nesses insetos, e o gene *Pax6* da mosca-da-fruta irá desencadear o desenvolvimento de olhos de camundongo nesses roedores. Em cada organismo, esses genes são parte de uma cascata regulatória muito maior que, em última análise, cria as estruturas corretas nos locais corretos em cada organismo. A cascata é antiga; por exemplo, os genes *Hox* (descritos no texto) têm sido parte do programa de desenvolvimento de eucariotos pluricelulares por mais de 500 milhões de anos. Mudanças sutis na cascata podem ter grandes efeitos no desenvolvimento e, portanto, na aparência final do organismo. Essas mesmas mudanças sutis podem alimentar uma evolução surpreendentemente rápida. Por exemplo, as 400 a 500 espécies descritas de ciclídeos (peixes com nadadeiras com espinhos) no Lago Malawi e no Lago Vitória no continente africano são todas derivadas de uma ou poucas populações que colonizaram cada um dos lagos nos últimos 100.000 a 200.000 anos. Os tentilhões de Galápagos simplesmente seguiram o caminho de evolução e mudança que os seres vivos têm trilhado há bilhões de anos.

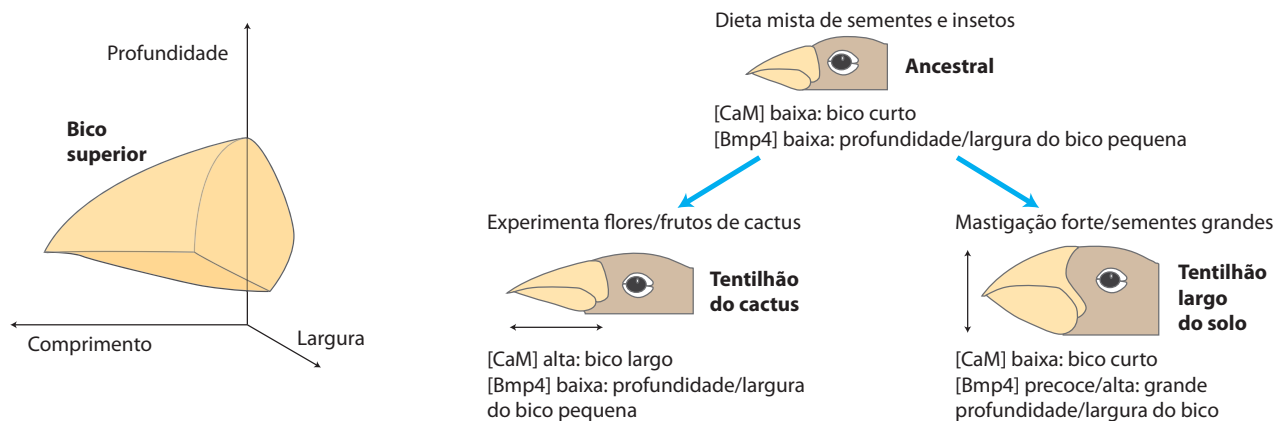



**FIGURA Q-1** Evolução de novas estruturas do bico para explorar novas fontes da alimentação. Nos tendilhões de Galápagos, as diferentes estruturas dos bicos do tendilhão de cactus e tendilhão grande do solo, que se alimentam de diferentes fontes de alimentos, se desenvolveram em grande parte devido a poucas mutações que alteram o momento e o nível de expressão de apenas dois genes: aqueles que codificam para calmodilina (CoM) e Bmp4.

- O desenvolvimento de um organismo pluricelular apresenta o desafio regulatório mais complexo. O destino das células no embrião inicial é determinado pelos gradientes de proteínas anteroposterior e dorsoventral que atuam como ativadores de transcrição ou repressores de tradução, regulando os genes necessários para o desenvolvimento de estruturas apropriadas a uma parte específica do organismo. Conjuntos de genes regulatórios operam em sucessão temporal e espacial, transformando determinadas áreas de uma célula ovo em estruturas previsíveis no organismo adulto.
- A diferenciação de células-tronco em tecidos funcionais pode ser controlada por sinais e condições extracelulares.

## Termos-chave

*Palavras em negrito são definidas no glossário*

genes constitutivos 1156
**indução** 1156
**repressão** 1156
fator de especificidade 1157
**repressor** 1157
**ativador** 1157
**operador** 1157
regulação negativa 1157
regulação positiva 1157
regulador arquitetônico 1158
**óperon** 1159
hélice-volta-hélice 1162
**dedo de zinco** 1162
**homeodomínio** 1163
**homeobox** 1163
**zíper de leucina** 1163
hélice-alça-hélice básica 1163
**controle combinatorial** 1164
**proteína receptora de cAMP (CRP)** 1165
**regulon** 1166
atenuação de transcrição 1167
**repressor de tradução** 1170
resposta estringente 1171
***riboswitch*** 1172
variação de fase 1173
remodelação da cromatina 1175
SWI/SNF 1175
acetiltransferases de histona (HAT) 1176
**potenciadores** 1178
sequências ativadoras a montante (UAS) 1178
ativadores de transcrição 1178
coativadores 1178
fatores de transcrição basais 1178
grupo de alta mobilidade (HMG) 1179
Mediador 1179
complexo de pré-iniciação (PIC) 1179
proteína ligadora de TATA (TBP) 1179
**elementos de resposta hormonal (HRE)** 1182
**microRNA (miRNA)** 1185
RNA de interferência (RNAi) 1185
**ncRNA** 1186
**polaridade** 1187
**metameria** 1187
genes maternos 1188
mRNA maternos 1188
genes de segmentação 1188
genes gap 1188
genes *pair-rule* 1188
genes de polaridade dos segmentos 1188
**genes homeóticos** 1188
genes *Hox* 1190
totipotentes 1192
pluripotentes 1192
unipotentes 1192
células-tronco embrionárias 1192

## Leituras adicionais

### Gerais

**Carroll, S.B.** (2005) *Endless Forms Most Beautiful: The New Science of Evo Devo and the Making of the Animal Kingdom*, W. W. Norton & Company, New York.

Fascinante abordagem sobre como a biologia do desenvolvimento informa a biologia evolutiva.

**Neidhardt, F.C. (ed.).** Escherichia coli *and* Salmonella typhimurium, *Cellular and Molecular Biology* (Curtiss, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Magasanik, B., Low, K.B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., & Umbarger, H.E., vol. eds), American Society for Microbiology, Washington, DC.

Boa fonte de informação sobre a regulação gênica em bactérias e muitos outros tópicos. Publicado pela última vez em edição impressa em 1996, existe agora uma importante fonte *on-line*, continuamente atualizada: http://ecosal.org.

### Regulação da expressão gênica em bactérias

**Babitske, P., Baker, C.S., & Romeo, T.** (2009) Regulation of translation initiation by RNA binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 27–44.

**Jacob, F. & Monod, J.** (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **3**, 318–356.

O modelo óperon e o conceito de RNA mensageiro, propostos pela primeira vez no *Proceedings* da Academia Francesa de Ciências em 1960, são apresentados nesse artigo histórico.

**Osterberg., S., del Peso-Santos, T., & Shingler, V.** (2011) Regulation of alternative sigma factor use. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**, 37–55.

**Roth, A. & Breaker, R.R.** (2009) The structural and functional diversity of metabolite-binding riboswitches. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 305–334.

### Regulação da expressão gênica em eucariotos

**Berezikov, E.** (2011) Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 846–860.

**Conaway, R.C. & Conaway, J.W.** (2011) Function and regulation of the Mediator complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 225–230.

**Fabian, M.R., Sonenberg, N. & Filipowicz, W.** (2010) Regulation of mRNA translation. and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 351–379.

**Groppo, R. & Richter, J.D.** (2009) Translational control from head to tail. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 444–451.

**Keene, J.D.** (2007) RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 533–543.

**Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W.** (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 597–610.

**Pasquinelli, A.E.** (2012) MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 271–282.

**Prud'homme, B., Gompel, N., & Carroll, S.B.** (2007) Emerging principles of regulatory evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 8605–8612.

**Rinn, J.L. & Chang, H. Y.** (2012) Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 145–166.

**Shahbazian, M.D. & Grunstein, M.** (2007) Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 75–100.

**Struhl, K.** (1999) Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell* **98**, 1–4.

**Talbert, P.B. & Henikoff, S.** (2010) Histone variants – ancient wrap artists of the epigenome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11,** 264–275.

**Werner, F. & Grohmann, D.** (2011) Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 85–98.

**Zhou, Q., Li, T., & Price, D.H.** (2012) RNA polymerase II elongation control. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 119–143.

## Problemas

**1. Efeito do mRNA e da estabilidade proteica na regulação.** Células de *E. coli* estão crescendo em um meio com glicose como única fonte de carbono. Triptofano é subitamente adicionado. As células continuam a crescer e se dividem a cada 30 minutos. Descreva (qualitativamente) como a intensidade de atividade da triptofano-sintase nas células varia com o tempo sob as seguintes condições:

(a) O mRNA *trp* é estável (degradado lentamente ao longo de várias horas).

(b) O mRNA *trp* é degradado rapidamente mas a triptofano-sintase é estável.

(c) O mRNA *trp* e a triptofano-sintase são ambos degradados rapidamente.

**2. O óperon da lactose.** Um pesquisador constrói um óperon *lac* em um plasmídeo, mas inativa todas as partes do operador *lac* (*lacO*) e o promotor *lac*, substituindo-os pelo sítio de ligação para o repressor LexA (que atua na resposta SOS) e um promotor regulado por LexA. O plasmídeo é introduzido nas células de *E. coli* que têm um óperon *lac* com um gene *lacZ* inativo. Em que condições essas células transformadas irão produzir β-galactosidase?

**3. Regulação negativa.** Descreva os efeitos prováveis na expressão gênica no óperon *lac* de uma mutação no (a) operador *lac* que exclui a maioria dos $O_1$, (b) gene *lacI* que inativa o repressor e (c) promotor que altera a região em torno da posição –10.

**4. Ligação específica do DNA por proteínas regulatórias.** Uma típica proteína repressora bacteriana diferencia seu sítio de ligação específico (operador) e o DNA não específico por um fator de $10^4$ a $10^6$. Cerca de 10 moléculas de repressor por célula são suficientes para garantir um alto nível de repressão. Suponha que um repressor muito semelhante existisse em uma célula humana, com especificidade por seu sítio de ligação. Quantas cópias do repressor seriam necessárias para provocar um nível de repressão semelhante àquele na célula bacteriana? (Dica: o genoma de *E. coli* contém cerca de 4,6 milhões de pb; o genoma haploide humano tem cerca de 3,2 bilhões de pb).

**5. Concentração de repressor em *E. coli*.** A constante de dissociação para um complexo repressor-operador específico é muito baixa, cerca de $10^{-13}$ M. Uma célula de *E. coli* (volume $2 \times 10^{-12}$ mL) contém 10 cópias do repressor. Calcule a concentração celular da proteína repressora. Como esse valor se compara à constante de dissociação do complexo repressor--operador? Qual o significado dessa resposta?

**6. Repressão de catabólitos.** Células de E. *coli* estão crescendo em um meio contendo lactose mas não glicose. Indique se cada uma das seguintes alterações ou condições aumentaria, diminuiria ou não alteraria a expressão do óperon *lac*. Pode ser útil desenhar um modelo representando o que está acontecendo em cada situação.

(a) Adição de alta concentração de glicose

(b) Mutação que impeça a dissociação do repressor Lac do operador

(c) Mutação que inative completamente a β-galactosidase

(d) Mutação que inative completamente a galactosídeo--permease

(e) Mutação que impeça a ligação do CRP ao seu sítio de ligação perto do promotor *lac*

**7. Atenuação da transcrição.** Como a transcrição do óperon *trp* de *E. coli* pode ser afetada pelas seguintes manipulações da região líder do mRNA *trp*?

(a) Aumentando a distância (número de bases) entre o gene do peptídeo líder e a sequência 2

(b) Aumentando a distância entre as sequências 2 e 3

(c) Removendo a sequência 4

(d) Alterando os dois códons Trp no gene do peptídeo para códons His

(e) Eliminando o sítio de ligação do ribossomo para o gene que codifica o peptídeo líder

(f) Alterando vários nucleotídeos na sequência 3 de modo que ela possa se parear com a sequência 4, mas não com a sequência 2

**8. Repressores e repressão.** Como a resposta SOS em *E. coli* seria afetada por uma mutação no gene *lexA* que impeça a clivagem autocatalítica da proteína LexA?

**9. Regulação por recombinação.** No sistema de variação de fase da *Salmonella*, o que aconteceria à célula se a recombinase Hin se tornasse mais ativa e promovesse a recombinação (inversão de DNA) várias vezes em cada geração celular?

**10. Iniciação da transcrição em eucariotos.** Uma nova atividade da RNA-polimerase é descoberta em extratos brutos de células derivadas de um fungo exótico. A RNA-polimerase inicia a transcrição apenas a partir de um único promotor, altamente especializado. À medida que a polimerase é purificada, sua atividade diminui e a enzima purificada é completamente inativa, a menos que extrato bruto seja adicionado à mistura de reação. Sugira uma explicação para essas observações.

**11. Domínios funcionais em proteínas regulatórias.** Um bioquímico substitui o domínio de ligação de DNA da proteína Gal4 de levedura pelo domínio de ligação de DNA do repressor Lac, e descobre que a proteína fabricada não regula mais a transcrição dos genes *GAL* em leveduras. Desenhe um diagrama dos diferentes domínios funcionais que você esperaria encontrar na proteína Gal4 e na proteína fabricada. Por que a proteína fabricada não regula mais a transcrição dos genes *GAL*? O que poderia ser feito ao sítio de ligação do DNA reconhecido por essa proteína quimérica para torná-la funcional na ativação da transcrição dos genes *GAL*?

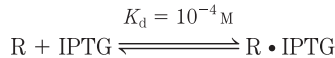
**12. Modificação do nucleossomo durante a ativação da transcrição.** A fim de preparar regiões do genoma para a transcrição, certas histonas nos nucleossomos residentes são acetiladas e metiladas em locais específicos. Uma vez que a transcrição não seja mais necessária, essas modificações precisam ser revertidas. Em mamíferos, a metilação dos resíduos Arg em histonas é revertida pelas peptidilargininas-deiminases (PADI). A reação promovida por essas enzimas não produz uma arginina não metilada. Em vez disso, ela produz resíduos de citrulina na histona. Qual é o outro produto da reação? Sugira um mecanismo para essa reação.

**13. Mecanismos de herança no desenvolvimento.** Um ovo de *Drosophila* que é $bcd^-/bcd^-$ pode se desenvolver normalmente, mas a mosca-da-fruta adulta não será capaz de produzir prole viável. Explique.

## Problema de análise de dados

**14. Fabricando um interruptor genético alternado em *Escherichia coli*.** A regulação gênica é frequentemente descrita como fenômeno "ligado ou desligado" – um gene que é expresso totalmente ou não expresso de forma alguma. Na verdade, a repressão e ativação de um gene envolvem reações de ligação de ligantes, de modo que os genes podem apresentar níveis intermediários de expressão quando níveis intermediários de moléculas regulatórias estão presentes. Por exemplo, para o óperon *lac* de *E. coli*, considere o equilíbrio de ligação do repressor Lac, do operador de DNA e do indutor (ver Figura 28-8). Embora isso seja um processo complexo e cooperativo, ele pode ser aproximadamente modelado pela

reação a seguir (R é o repressor; IPTG é o indutor isopropil-β--D tiogalactosídeo):

$$\mathrm{R} + \mathrm{IPTG} \xrightleftharpoons{K_d = 10^{-4}\,\mathrm{M}} \mathrm{R} \bullet \mathrm{IPTG}$$

O repressor livre, R, se liga ao operador e impede a transcrição do óperon *lac*; o complexo R • IPTG não se liga ao operador e, portanto, a transcrição do óperon *lac* pode prosseguir.

(a) Usando a Equação 5-8, pode-se calcular o nível de expressão relativa de proteínas do óperon *lac* como uma função de [IPTG]. Use esse cálculo para determinar em que faixa de [IPTG] o nível de expressão variaria de 10% a 90%.

(b) Descreva qualitativamente o nível de proteínas do óperon *lac* presente em uma célula de *E. coli* antes, durante e depois de indução por IPTG. Não precisa fornecer as quantidades nos tempos exatos – apenas indicar as tendências gerais.

Gardner, Cantor e Collins (2000) se propuseram a construir um "interruptor genético alternado" (*genetic toggle switch*) – um sistema regulatório de genes com as duas características essenciais um interruptor de luz. (A) *Ele tem apenas dois estados*: totalmente ligado ou totalmente desligado; não se trata de um interruptor com graduação. Em termos bioquímicos, o gene-alvo ou sistema de genes (óperon) é expresso totalmente ou não expresso de maneira alguma; não se expressa em nível intermediário. (B) *Ambos os estados são estáveis:* embora você use o dedo para mudar o interruptor de luz de um estado para o outro, uma vez que o tenha alterado e recolhido o dedo, o interruptor permanece naquele estado. Em termos bioquímicos, a exposição a um indutor ou a algum outro sinal altera o estado de expressão do gene ou óperon, e ele permanece naquele estado uma vez que o sinal seja removido.

(c) Explique como o óperon *lac* não apresenta nenhuma das características A e B.

Para construir seu "interruptor alternado", Gardner e colaboradores construíram um plasmídeo a partir dos seguintes componentes:

$OP_{lac}$ A região operador-promotor do óperon *lac* de *E. coli*

$OP_{\lambda}$ A região operador-promotor do fago λ

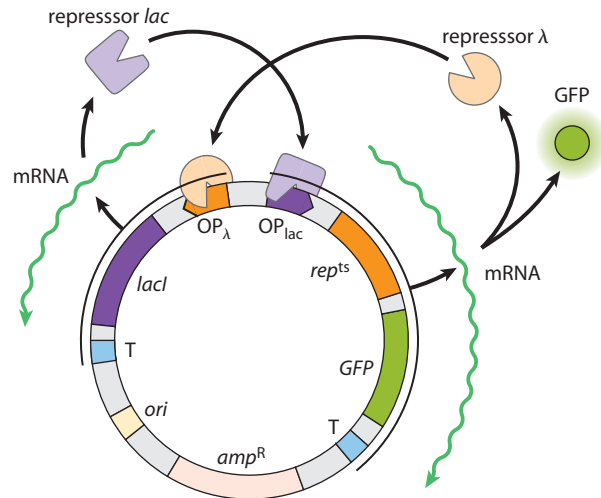
*lacI* O gene que codifica a proteína repressora do *lac*, LacI. Na ausência de IPTG, essa proteína reprime fortemente o $OP_{lac}$; na presença de IPTG, ela permite a expressão total de $OP_{lac}$.

*$rep^{ts}$* O gene que codifica uma proteína λ repressora mutante sensível à temperatura, $rep^{ts}$. A 37°C essa proteína reprime fortemente $OP_{\lambda}$; a 42°C ela permite a expressão total de $OP_{\lambda}$.

*GFP* O gene para a proteína fluorescente verde (GFP), proteína indicadora altamente fluorescente (ver Figura 9-16)

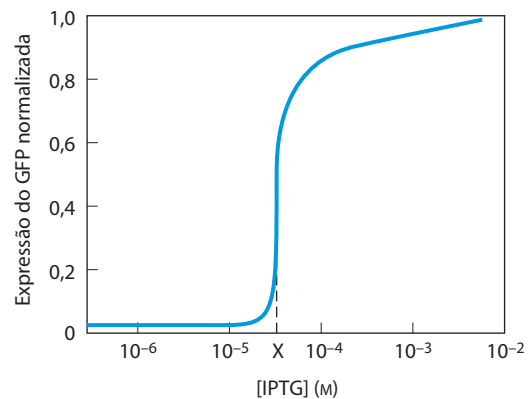
T Terminador de transcrição

Os pesquisadores dispuseram esses componentes (ver figura a seguir) de modo que os dois promotores foram reprimidos reciprocamente: $OP_{lac}$ controlava a expressão de *$rep^{ts}$* e $OP_{\lambda}$ controlava a expressão de *lacI*. O estado desse sistema era registrado pelo nível de expressão de *GFP*, que também estava sob controle de $OP_{lac}$.

(d) O sistema construído tem dois estados: GFP-ligado (alto nível de expressão) e GFP-desligado (baixo nível de expressão). Para cada estado, descreva quais proteínas estão presentes e quais promotores estão sendo expressos.

(e) Espera-se que o tratamento com IPTG alterne o sistema de um estado a outro. De qual estado para qual estado? Explique sua argumentação.

(f) Espera-se que o tratamento com calor (42°C) alterne o sistema de um estado para o outro. De qual estado para qual estado? Explique sua argumentação.

(g) Por que se espera que esse plasmídeo tenha as características A e B descritas anteriormente?

A fim de confirmar que o seu construto de fato exibe essas características, Gardner e colaboradores demonstraram pela primeira vez que, uma vez ligada, o nível de expressão do GFP (alto ou baixo) era estável por longos períodos de tempo (característica B). Em seguida, eles mediram o nível de GFP em diferentes concentrações do indutor IPTG, com os seguintes resultados.

Eles notaram que o nível médio de expressão do GFP foi intermediário na concentração X de IPTG. Entretanto, ao medirem o nível de expressão de GFP em *células individuais* com [IPTG] = X, eles descobriram um alto ou baixo nível de GFP – nenhuma célula apresentou nível intermediário.

(h) Explique como essa descoberta demonstra que o sistema tem um A característico. O que está acontecendo para provocar uma distribuição bimodal dos níveis de expressão no [IPTG] = X?

## Referência

**Gardner, T.S., Cantor, C.R., & Collins, J.J.** (2000) Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature* **403**, 339–342.

# Respostas Resumidas aos Problemas

Soluções completas de todos os problemas dos capítulos estão publicadas no *Guia de estudo completo e definitivo que acompanha* a obra *Princípios de Bioquímica.* As respostas de todos os problemas numéricos estão expressas com o número correto de dígitos significativos.

## Capítulo 1

1. **(a)** Diâmetro da célula ampliada = 500 mm **(b)** $2{,}7 \times 10^{12}$ moléculas de actina **(c)** 36.000 mitocôndrias **(d)** $3{,}9 \times 10^{10}$ moléculas de glicose **(e)** 50 moléculas de glicose por molécula de hexocinase.
2. **(a)** $1 \times 10^{-12}$g = 1 pg **(b)** 10% **(c)** 5%.
3. **(a)** 1,6 mm; 800 vezes mais comprido do que a célula; o DNA deve estar firmemente enrolado. **(b)** 4.000 proteínas.
4. **(a)** A taxa metabólica é limitada pela difusão, por sua vez limitada pela área da superfície **(b)** 12 $\mu m^{-1}$ para a bactéria; 0,04 $\mu m^{-1}$ para a ameba; a relação superfície-volume é 300 vezes maior na bactéria.
5. $2 \times 10^6$ s (em torno de 23 dias).
6. As moléculas de vitamina das duas fontes são idênticas; o corpo não consegue distinguir a fonte; somente impurezas associadas poderiam variar com a fonte.
7.

**(a)** $H_3\overset{+}{N}$–CH₂–CH₂–OH — Amino; Hidroxila

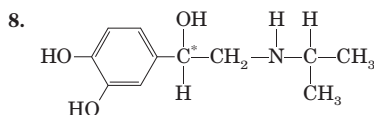
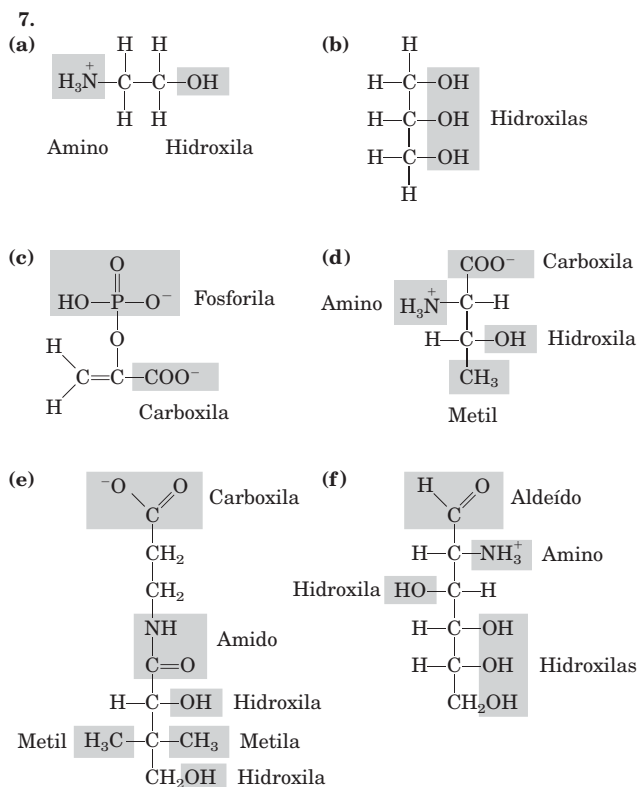
**(b)** H–C(OH)–C(OH)–C(OH)–H — Hidroxilas

**(c)** Fosforila; Carboxila

**(d)** Carboxila; Amino; Hidroxila; Metil

**(e)** Carboxila; Amido; Hidroxila; Metil; Metila; Hidroxila

**(f)** Aldeído; Amino; Hidroxila; Hidroxilas

8. HO–(HO)C₆H₃–C*H(OH)–CH₂–NH–CH(CH₃)–CH₃

Os dois enantiômeros têm interações diferentes com um "receptor" quiral biológico (uma proteína).

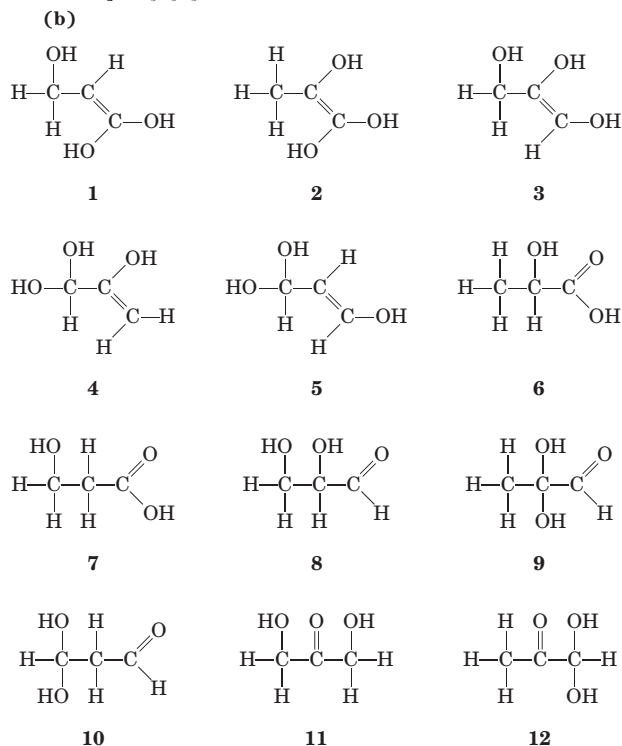
9. **(a)** Somente os aminoácidos têm grupos amino; a separação pode ser com base na carga ou na afinidade de ligação desses grupos. Os ácidos graxos são menos solúveis em água do que os aminoácidos, e os dois tipos de moléculas também diferem em formato e tamanho – cada uma dessas diferenças de propriedades pode servir de base para separação. **(b)** A molécula de glicose é menor do que um nucleotídeo; a separação pode se basear no tamanho. A base nitrogenada e/ou o grupo fosfato também dota os nucleotídeos com características (solubilidade, carga) que podem ser usadas para separá-los da glicose.
10. É improvável que o silício possa servir como o elemento constituinte fundamental para a vida, especialmente em uma atmosfera de $O_2$ como a da Terra. Longas cadeias de átomos de silício não são facilmente sintetizadas; as macromoléculas necessárias para as funções mais complexas não seriam formadas facilmente. O oxigênio rompe ligações entre átomos de silício, e as ligações oxigênio-silício são extremamente estáveis e difíceis de romper, impedindo a formação e a quebra de ligações, o que é essencial para os processos vitais.
11. Somente um enantiômero do fármaco foi fisiologicamente ativo. A dexedrina consiste em um enantiômero simples; a benzedrina consiste em uma mistura racêmica.
12. **(a)** 3 grupos de ácido fosfórico; α-D-ribose; guanina **(b)** Colina; ácido fosfórico; glicerol; ácido oleico; ácido palmítico **(c)** Tirosina; 2 glicinas; fenilalanina; metionina.
13. **(a)** $CH_2O$; $C_3H_6O_3$.

**(b)**

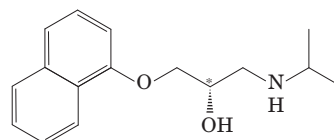
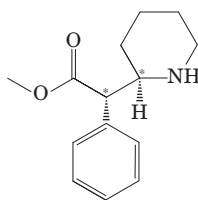
1 2 3

4 5 6

7 8 9

10 11 12

**(c)** X contém um centro quiral; elimina todos, exceto **6** e **8**. **(d)** X contém um grupo funcional ácido; elimina **8;** a estrutura **6 é** consistente com todos os dados. **(e)** A estrutura **6**; não é possível distinguir entre os dois possíveis enantiômeros.

14. O composto mostrado é o (*R*)-propanolol; o carbono que carrega o grupo hidroxila é o quiral. O (*S*)-propanolol tem a estrutura:

O, OH, N, H

**15.** O composto mostrado é o (*S,S*)-metilfenidato. O (*R,R*)- metilfenidato tem a estrutura:

Os carbonos quirais estão indicados com asterisco.

**16.** **(a)** Um $\Delta G°$ mais negativo corresponde a um maior $K_{eq}$ para a reação de ligação, de forma que o equilíbrio é desviado no sentido da formação dos produtos e ligação mais forte – e, por isso, de um gosto mais doce e uma DMR maior. **(b)** Ensaios de gosto doce, com base em animais, são muito demorados. Um programa de computador para predizer o nível de doçura, mesmo que nem sempre totalmente preciso, permite aos químicos projetar adoçantes eficazes muito mais rapidamente. As moléculas candidatas podem então ser testadas por meio dos ensaios convencionais. **(c)** A variação de 0,25 a 0,4 nm corresponde ao comprimento de cerca de 1,5 a 2,5 ligações simples. A figura a seguir pode ser usada para a construção de uma régua aproximada; todos os átomos no retângulo vermelho-claro estão entre 0,25 e 0,4 nm do início da régua.

Existem muitos grupos AH-B possíveis nas moléculas; alguns estão mostrados aqui.

Desoxissacarose

Sacarose

D-Triptofano

Sacarina

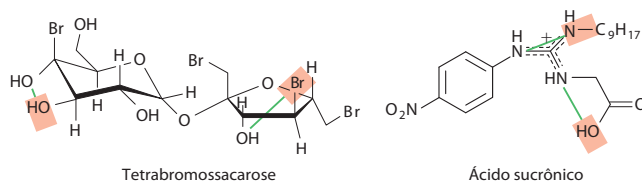
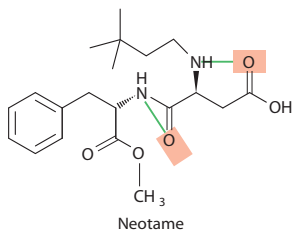
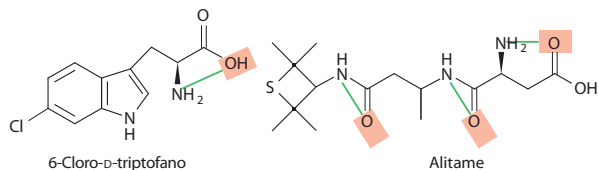
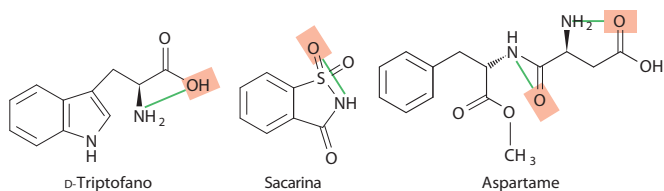
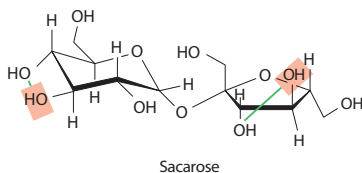
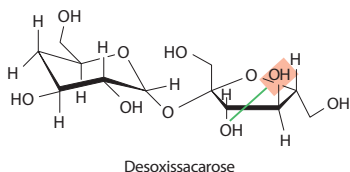
Aspartame

6-Cloro-D-triptofano

Alitame

Neotame

Tetrabromossacarose

Ácido sucrônico

**(d)** Em primeiro lugar, as moléculas têm múltiplos grupos AH-B, de forma que é difícil saber qual é o importante. Em segundo lugar, uma vez que o motivo AH-B é muito simples, muitas moléculas não doces terão esse grupo. **(e)** A sacarose e a desoxissacarose. A desoxissacarose não tem um dos grupos AH-B que está presente na sacarose e tem DMR ligeiramente mais baixa do que a da sacarose – como esperado se os grupos AH-B forem importantes para o sabor doce. **(f)** Existem muitos desses exemplos, aqui estão alguns: (1) o D-triptofano e o 6-cloro-D-triptofano têm o mesmo grupo AH-B, mas os valores de DMR são muito diferentes. (2) O aspartame e o neotame têm os mesmos grupos AH-B, mas os valores de DMR são muito diferentes. (3) O neotame tem dois grupos AH-B, e o alitame tem três, porém o neotame é mais de cinco vezes mais doce do que o alitame. (4) A bromina é menos eletronegativa do que o oxigênio, e assim espera-se que enfraqueça os grupos AH-B, no entanto a tetrabromossacarose é muito mais doce do que a sacarose. **(g)** Pode-se elaborar qualquer modelo que se adapte a um conjunto definido de dados desde que os parâmetros sejam suficientemente "aprimorados". Uma vez que o objetivo era criar um modelo para predizer o $\Delta G°$ de moléculas não testadas *in vivo*, os pesquisadores precisavam mostrar que o modelo funciona para moléculas que não haviam sido "treinadas". O grau de inexatidão do grupo-teste poderia fornecer aos pesquisadores uma ideia de como o modelo se comportaria para moléculas novas. **(h)** A DMR está relacionada com $K_{eq}$, que está relacionado exponencialmente com $\Delta G°$; assim, a adição de uma quantidade constante à $\Delta G°$ multiplica a DMR por uma quantidade constante. Com base nos valores dados com as estruturas, uma variação de 1,3 kcal/mol na $\Delta G°$ corresponde a uma variação de 10 vezes na DMR.

## Capítulo 2

**1.** O etanol é polar e o etano não é. O grupo —OH do etanol pode fazer ligação de hidrogênio com a água.

**2.** **(a)** 4,76 **(b)** 9,19 **(c)** 4,0 **(d)** 4,82.

**3.** **(a)** $1{,}51 \times 10^{-4}$ M **(b)** $3{,}02 \times 10^{-7}$ M **(c)** $7{,}76 \times 10^{-12}$ M.

**4.** 1,1.

**5.** **(a)** $HCl \rightleftharpoons H^+ + Cl^-$ **(b)** 3,3 **(c)** $NaOH \rightleftharpoons Na^+ + OH^-$ **(d)** 9,8.

**6.** 1,1.

**7.** $1{,}7 \times 10^{-9}$ moléculas de acetilcolina.

**8.** 0,1 M HCl.

**9.** **(a)** maior **(b)** mais alto **(c)** mais baixo.

**10.** 3,3 mL.

**11.** **(a)** $RCOO^-$ **(b)** $RNH_2$ **(c)** $H_2PO_4^-$ **(d)** $HCO_3^-$.

**12.** **(a)** 5,06 **(b)** 4,28 **(c)** 5,46 **(d)** 4,76 **(e)** 3,76.

**13.** **(a)** 0,1 M HCl **(b)** 0,1 M NaOH **(c)** 0,1 M NaOH.

**14.** **(d)** O bicarbonato, uma base fraca, titula —OH a $—O^-$, tornando o composto mais polar e mais solúvel em água.

**15.** O estômago; a forma neutra da aspirina presente em pH mais baixo é menos polar e atravessa a membrana mais facilmente.

**16.** 9.

**17.** 7,4.

**18.** **(a)** pH 8,6 a 10,6 **(b)** 4/5 **(c)** 10 mL **(d)** pH = $pK_a$ −2.

**19.** 8,9.

**20.** 2,4.

**21.** 6,9.

**22.** 1,4.

**23.** $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 5,8 g/L; $Na_2HPO_4$, 8,2 g/L.

**24.** $[A^-]/[HA] = 0{,}10$.

**25.** Misture 150 mL de acetato de sódio 0,10 M com 850 mL de ácido acético 0,10 M.

**26.** Ácido acético; seu $pK_a$ está mais próximo do pH desejado.

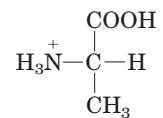
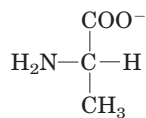
**27.** **(a)** 4,6 **(b)** 0,1 unidade de pH **(c)** 4 unidades de pH.

**28.** 4,3.

**29.** Acetato 0,13 M e ácido acético 0,07 M.

**30.** 1,7.

**31.** 7.

**32.** **(a)**

COOH / $H_3\overset{+}{N}$—C—H / $CH_3$ — Completamente protonado

$COO^-$ / $H_2N$—C—H / $CH_3$ — Completamente desprotonado

**(b)** completamente protonado **(c)** zwitteríon **(d)** zwitteríon **(e)** completamente desprotonado.

**33.** **(a)** O pH do sangue é controlado pelo sistema tampão dióxido de carbono-bicarbonato, $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$. Durante a *hipoventilação*, a $[CO_2]$ aumenta nos pulmões e no sangue arterial, levando o equilíbrio para a direita, aumentando o $[H^+]$ e baixando o pH. **(b)** Durante a *hiperventilação,* a $[CO_2]$ diminui nos pulmões e no sangue arterial, o que reduz a $[H^+]$ e aumenta o pH acima do valor normal de 7,4. **(c)** O lactato é um ácido moderadamente forte, que se dissocia completamente em condições fisiológicas e dessa forma reduz o pH do sangue e do tecido muscular. A hiperventilação remove $H^+$, o que eleva o pH do sangue e dos tecidos antecipando-se à acidificação.

**34.** 7,4

**35.** Dissolvendo-se mais $CO_2$ no sangue, aumenta a $[H^+]$ no sangue e nos fluidos extracelulares, reduzindo o pH: $CO_2$ (d) + $H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$.

**36.** **(a)** Use a substância na sua forma surfactante para emulsificar o óleo derramado, colete o óleo emulsificado e troque para a forma não surfactante. A água se separa do óleo, e este pode ser coletado para uso posterior. **(b)** O equilíbrio se encontra fortemente para a direita. O ácido mais forte (com $pK_a$ mais baixo), $H_2CO_3$, doa um próton para a base conjugada do ácido mais fraco (com $pK_a$ mais alto), amidina. **(c)** A força de um surfactante depende da hidrofilicidade de seus grupos polares: quanto mais hidrofílico, mais poderoso é o surfactante. A forma amidínio do s-surf é muito mais hidrofílica do que a forma amidina, e ele é um surfactante muito mais poderoso. **(d)** *Ponto A:* amidínio; o $CO_2$ teve tempo de sobra para reagir com o amidina e produzir a forma amidínio. *Ponto B:* amidina; o argônio removeu o $CO_2$ da solução, sobrando a forma amidina. **(e)** A condutividade aumenta quando o amidínio sem carga reage com o $CO_2$ e produz a forma amidina carregada. **(f)** A condutividade diminui quando o amídinio remove o $CO_2$ o que desloca o equilíbrio para a forma amidina sem carga. **(g)** Tratar s-surf com $CO_2$ para produzir a forma surfactante do amidínio e usá-lo para emulsificar o derramamento. Tratar a emulsão com argônio para remover o $CO_2$ e produzir a forma amidina não surfactante. O óleo será separado da água e poderá ser recuperado.

## Capítulo 3

**1.** L; determinar a configuração absoluta no carbono $\alpha$ e compará-la com as formas D e L do gliceraldeído.

**2.** **(a)** I **(b)** II **(c)** IV **(d)** II **(e)** IV **(f)** II e IV **(g)** III **(h)** III **(i)** V **( j)** III **(k)** V **(l)** II **(m)** III **(n)** V **(o)** I, III e V.

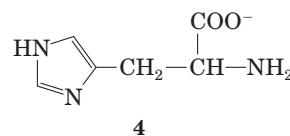
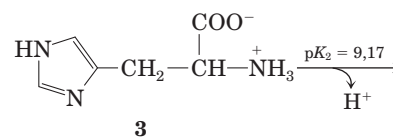
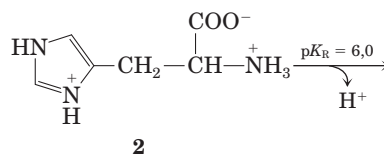
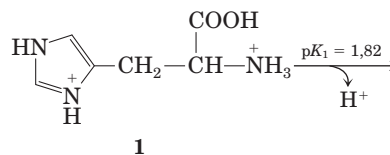
**3.** **(a)** O pI > $pK_a$ para o grupo $\alpha$-carboxila e pI < $pK_a$ para o grupo $\alpha$-amino, de maneira que os dois grupos estão carregados (ionizados). **(b)** 1 em $2{,}19 \times 10^7$. O pI da alanina é 6,01. Conforme a Tabela 3-1 e a equação de Henderson-Hasselbalch, 1/4.680 grupos carboxila e 1/4.680 grupos amino estão sem carga. A fração de moléculas de alanina com ambos os grupos não carregados é o produto dessas frações.

**4.** **(a) – (c)**

1: imidazol protonado (HN, $\overset{+}{N}$H)—$CH_2$—CH(COOH)—$\overset{+}{N}H_3$ $\xrightarrow{pK_1 = 1{,}82}$ $H^+$

2: imidazol protonado—$CH_2$—CH($COO^-$)—$\overset{+}{N}H_3$ $\xrightarrow{pK_R = 6{,}0}$ $H^+$

3: imidazol (HN, N)—$CH_2$—CH($COO^-$)—$\overset{+}{N}H_3$ $\xrightarrow{pK_2 = 9{,}17}$ $H^+$

4: imidazol (HN, N)—$CH_2$—CH($COO^-$)—$NH_2$

| pH | Estrutura | Carga resultante | Migração para |
|---|---|---|---|
| 1 | **1** | +2 | Cátodo |
| 4 | **2** | +1 | Cátodo |
| 8 | **3** | 0 | Não migra |
| 12 | **4** | −1 | Ânodo |

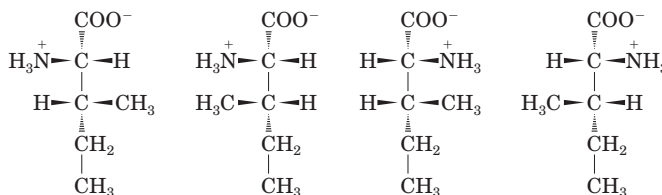
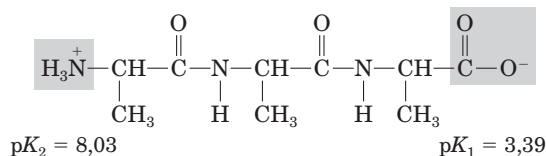
**5.** **(a)** Asp **(b)** Met **(c)** Glu **(d)** Gly **(e)** Ser

**6.** **(a)** 2 **(b)** 4 **(c)**

$COO^-$ / $H_3\overset{+}{N}$—C—H / H—C—$CH_3$ / $CH_2$ / $CH_3$;
$COO^-$ / $H_3\overset{+}{N}$—C—H / $H_3C$—C—H / $CH_2$ / $CH_3$;
$COO^-$ / H—C—$\overset{+}{N}H_3$ / H—C—$CH_3$ / $CH_2$ / $CH_3$;
$COO^-$ / H—C—$\overset{+}{N}H_3$ / $H_3C$—C—H / $CH_2$ / $CH_3$

**7.** **(a)** Estrutura em pH 7:

$H_3\overset{+}{N}$—CH($CH_3$)—C(=O)—N(H)—CH($CH_3$)—C(=O)—N(H)—CH($CH_3$)—C(=O)—$O^-$

$pK_2 = 8{,}03$ $\quad$ $pK_1 = 3{,}39$

**(b)** A interação eletrostática entre o ânion carboxilato e o grupo amino protonado do zwitteríon da alanina afeta favoravelmente a ionização do grupo carboxila. Essa interação eletrostática favorável diminui à medida que aumenta o comprimento da (poli)Ala, resultando em aumento no $pK_1$. **(c)** A ionização do grupo amino protonado destrói a interação eletrostática favorável observada em (b). Com o aumento da distância entre os grupos carregados, torna-se mais fácil a remoção do próton do grupo amino da (poli)Ala e dessa forma diminui o $pK_2$. Os efeitos intramoleculares das ligações amida (ligação peptídica) mantêm os valores de $pK_a$ mais baixos do que seriam no caso de uma amina alquil-substituída.

**8.** 75.000.

**9.** **(a)** 32.000. Os elementos são perdidos quando se forma a ligação peptídica, de modo que a massa molecular de um resíduo de Trp não é a mesma da do triptofano livre. **(b)** 2.

**10.** A proteína tem quatro subunidades, com massas moleculares de 160, 90, 90 e 60 kDa. As duas subunidade de 90 kDa (provavelmente idênticas) estão unidas por uma ou mais pontes dissulfeto.

**11.** **(a)** +2 em pH 3; 0 em pH 8; −1 em pH 11 **(b)** pI = 7,8.

**12.** pI ≈ 1; grupos carboxilato; Asp e Glu.

**13.** Lys, His, Arg; os grupos fosfato com carga negativa no DNA interagem com os grupos laterais das histonas com carga positiva.

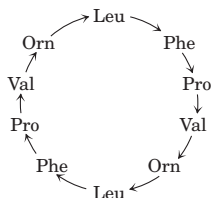
**14.** **(a)** $(Glu)_{20}$ **(b)** $(Lys–Ala)_3$ **(c)** $(Asn–Ser–His)_5$ **(d)** $(Asn–Ser–His)_5$

**15.** **(a)** A atividade específica após a etapa 1 é de 200 unidades/mg; etapa 2, 600 unidades/mg; etapa 3, 250 unidades/mg; etapa 4, 4.000 unidades/mg; etapa 5, 15.000 unidades/mg; etapa 6, 15.000 unidades/mg **(b)** Etapa 4 **(c)** Etapa 3 **(d)** Sim. Na etapa 6, a atividade específica não aumenta; eletroforese em poliacrilamida-SDS.

**16.** **(a)** [NaCl] = 0,5 mM **(b)** [NaCl] = 0,05 mM.

**17.** C elui primeiro, B em segundo lugar, A por último.

**18.** Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu

**19.**

As setas correspondem à orientação das ligações peptídicas, —CO →NH—.

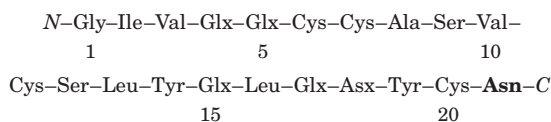
**20.** 88%, 97%. A porcentagem ($x$) dos resíduos corretos dos aminoácidos liberados no ciclo $n$ é $x_n/x$. Todos os resíduos liberados no primeiro ciclo estão corretos, mesmo que a eficiência da clivagem não tenha sido perfeita.

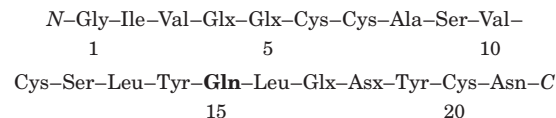
**21.** **(a)** Y(1), F(7) e R (9) **(b)** As posições 4 e 9; K (Lys) é mais comum na 4, R (Arg) não varia na 9 **(c)** Posições 5 e 10; E (Glu) é mais comum em ambas as posições **(d)** Posição 2; S (Ser).

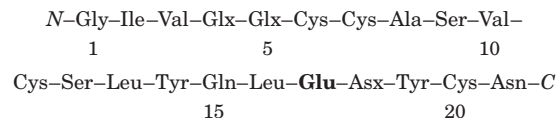
**22.** **(a)** peptídeo 2 **(b)** peptídeo 1 **(c)** peptídeo 2 **(d)** peptídeo 3.

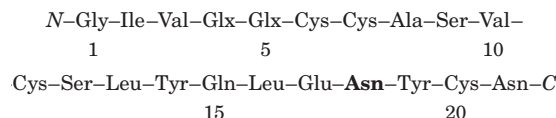
**23.** **(a)** Qualquer cadeia polipeptídica linear tem somente dois tipos de grupos amino livres: um único grupo α-amino na extremidade aminoterminal, e um grupo ε-amino em cada resíduo de Lys presente na cadeia. Esses grupos amino reagem com FDNB e formam um derivado DNP-aminoácido. A insulina produz dois tipos diferentes de derivados α-amino-DNP, sugerindo que ela tem duas extremidades aminoterminais e, portanto, duas cadeias polipeptídicas, uma com Gly aminoterminal e a outra com Phe aminoterminal. A Lys não está em extremidade aminoterminal, pois o produto DNP-lisina é ε-DNP-lisina. **(b)** Sim. A cadeia A tem Gly aminoterminal; a cadeia B tem Phe aminoterminal; e o resíduo 29 (não terminal) na cadeia B é Lys. **(c)** Phe-Val-Asp-Glu-. O peptídeo B1 mostra que o resíduo aminoterminal é Phe. O peptídeo B2 também tem Val, mas ela não é aminoterminal, pois não há formação de DNP-Val; ela deve estar no lado carboxílico da Phe. Assim, a sequência de B2 é DNP-Phe-Val. De modo semelhante, a sequência de B3 deve ser DNP-Phe-Val-Asp, e a sequência da cadeia A deve começar com Phe-Val-Asp-Glu-. **(d)** Não. A sequência aminoterminal conhecida da cadeia A é Phe-Val-Asn-Gln-. A Asn e a Gln aparecem na análise de Sanger como Asp e Glu porque a hidrólise vigorosa na etapa 7 hidrolisa as ligações amida na Gln e na Asn (assim como as ligações peptídicas), formando Asp e Glu. Sanger e colaboradores não puderam distinguir Asp de Asn e Gln de Glu nesse estágio de sua análise. **(e)** A sequência combina exatamente com a da Figura 3-24. Cada peptídeo na tabela dá uma informação específica sobre quais resíduos Axn são Asn ou Asp e quais resíduos Glx são Gln ou Glu.

*Ac1:* resíduos 20-21. Esta é a única sequência Cys-Asx na cadeia A; existe ~1 grupo amido neste peptídeo, assim deve ser Cys-Asn:

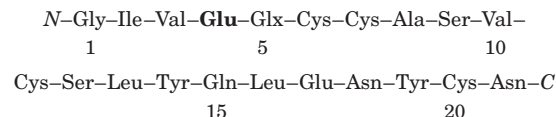
*N*–Gly–Ile–Val–Glx–Glx–Cys–Cys–Ala–Ser–Val–
1 5 10
Cys–Ser–Leu–Tyr–Glx–Leu–Glx–Asx–Tyr–Cys–**Asn**–*C*
15 20

*Ap15*: resíduos 14-15-16. Esta é a única sequência Tyr-Glx-Leu na cadeia A; existe ~ 1 grupo amido, portanto o peptídeo deve ser Tyr-Glu-Leu:

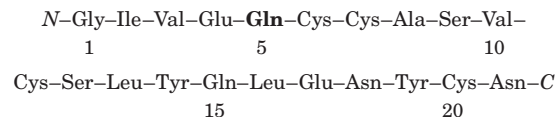
*N*–Gly–Ile–Val–Glx–Glx–Cys–Cys–Ala–Ser–Val–
1 5 10
Cys–Ser–Leu–Tyr–**Gln**–Leu–Glx–Asx–Tyr–Cys–Asn–*C*
15 20

*Ap14:* resíduos 14-15-16-17. Ela tem ~1 grupo amido, e já se sabe que o resíduo 15 é uma Gln, portanto o resíduo 17 deve ser Glu:

*N*–Gly–Ile–Val–Glx–Glx–Cys–Cys–Ala–Ser–Val–
1 5 10
Cys–Ser–Leu–Tyr–Gln–Leu–**Glu**–Asx–Tyr–Cys–Asn–*C*
15 20

*Ap3:* resíduos 18-19-20-21. Ela tem ~ 2 grupos amido, e sabe-se que o resíduo 21 é uma Asn, portanto o resíduo 18 deve ser uma Asn:

*N*–Gly–Ile–Val–Glx–Glx–Cys–Cys–Ala–Ser–Val–
1 5 10
Cys–Ser–Leu–Tyr–Gln–Leu–Glu–**Asn**–Tyr–Cys–Asn–*C*
15 20

*Ap1:* resíduos 17-18-19-20-21, o que faz sentido, pois os resíduos 18 e 21 são Asn.

*Ap5pa1:* resíduos 1-2-3-4. Ela não tem grupos amido; portanto, o resíduo 4 deve ser Glu:

*N*–Gly–Ile–Val–**Glu**–Glx–Cys–Cys–Ala–Ser–Val–
1 5 10
Cys–Ser–Leu–Tyr–Gln–Leu–Glu–Asn–Tyr–Cys–Asn–*C*
15 20

*Ap5:* resíduos de 1 a 13. Ela tem ~ 1 grupo amido, e sabe-se que o resíduo 4 é Glu; portanto, o resíduo 5 deve ser Gln:

*N*–Gly–Ile–Val–Glu–**Gln**–Cys–Cys–Ala–Ser–Val–
1 5 10
Cys–Ser–Leu–Tyr–Gln–Leu–Glu–Asn–Tyr–Cys–Asn–*C*
15 20

## Capítulo 4

**1.** **(a)** Ligações mais curtas têm ordem de ligação mais alta (são múltiplas em vez de simples) e são mais fortes. A ligação peptídica C—N é mais forte do que a ligação simples e está, em qualidade, a meio caminho entre ligação simples e dupla. **(b)** A rotação da ligação peptídica é difícil em temperaturas fisiológicas em virtude do seu caráter de ligação dupla parcial.

**2.** **(a)** As unidades estruturais principais da fibra polipeptídica da lã (α-queratina) são sucessivas voltas da hélice α, com distâncias de 5,4 Å; a espiral enrolada produz o espaçamento de 5,2 Å. A fervura e o estiramento da fibra geram uma cadeia polipeptídica estendida na conformação β, com distância de cerca de 7,0 Å entre os grupos R adjacentes. A fibra se encurta quando o polipeptídeo retorna à conformação de hélice α. **(b)** A lã processada encolhe quando as cadeias polipeptídicas são convertidas da conformação β estendida para a conformação nativa de hélice α na presença de calor úmido. A estrutura da seda – folhas β, com suas pequenas cadeias laterais de aminoácidos bem empacotadas – é mais estável do que a lã.

**3.** ~ 42 ligações peptídicas por segundo.

**4.** Em pH > 6, os grupos carboxílicos da poli(Glu) estão desprotonados; a repulsão entre os grupos carboxilato carregados negativamente leva ao desdobramento. De modo similar, em pH 7, os grupos amino da poli(Lys) estão protonados; a repulsão entre esses grupos carregados positivamente também leva ao desdobramento.

**5.** **(a)** As pontes dissulfeto são ligações covalentes, que são muito mais fortes do que as interações não covalentes que estabilizam a maioria das proteínas. Elas fazem ligações intercadeias, aumentando sua ri-

gidez, força mecânica e resistência. **(b)** Os resíduos de cistina (com ligações dissulfeto) impedem o desdobramento total da proteína.

**6.** $\phi$ = (f) e $\psi$ = (e)

**7.** **(a)** Curvaturas são mais prováveis nos resíduos 7 e 19; os resíduos Pro na configuração *cis* acomodam bem as voltas. **(b)** Os resíduos Cys nas posições 13 e 24 podem formar ligações dissulfeto. **(c)** Superfície externa: resíduos polares e carregados (Asp, Gln, Lys); interior: resíduos alifáticos e apolares (Ala, Ile); Thr, embora polar, tem um índice de hidropatia próximo de zero e, portanto, pode ser encontrado na superfície externa e no interior da proteína.

**8.** Trinta resíduos de aminoácidos; 0,87

**9.** A mioglobina é toda tridimensional. A estrutura dobrada, o "enovelamento da globina", é um motivo encontrado em todas as globinas. O polipeptídeo se dobra em um domínio único, o qual representa a estrutura tridimensional inteira dessa proteína.

**10.** Proteína (a), um barril $\beta$, é descrita pela curva de Ramachandran (c), que mostra a maioria das conformações permitidas no quadrante superior esquerdo no qual estão concentrados os ângulos de ligação característicos da conformação $\beta$**;** (b) uma série de hélices $\alpha$ é descrita pela curva (d), na qual a maioria das conformações permitidas está no quadrante inferior esquerdo.

**11.** A enzima bacteriana é uma colagenase; ela destrói a barreira de tecido conectivo do hospedeiro, o que permite a invasão dos tecidos pela bactéria. Bactérias não têm colágeno.

**12.** **(a)** O número de DNP-valina formado por mol de proteína se iguala ao número de extremidades aminoterminais e, portanto, ao número de cadeias polipeptídicas. **(b)** 4 **(c)** Cadeias diferentes provavelmente migram no gel de poliacrilamida-SDS como bandas separadas.

**13.** (a); ele tem mais resíduos de aminoácidos que favorecem a estrutura em hélice $\alpha$ (ver Tabela 4-1).

**14.** **(a)** Os resíduos aromáticos parecem ter um papel importante na estabilização das fibrilas amiloides. Assim, as moléculas com substituintes aromáticos podem inibir a formação do amiloide por interferirem no empilhamento ou na associação das cadeias laterais aromáticas. **(b)** O amiloide se forma no pâncreas em associação ao diabetes tipo 2, assim como no cérebro na doença de Alzheimer. Embora as fibrilas amiloides envolvam proteínas diferentes nas duas doenças, a estrutura básica do amiloide é semelhante, sendo também estabilizado de forma semelhante em ambas, tornando-se, portanto, alvos potenciais de fármacos similares projetados para romper sua estrutura.

**15.** **(a)** Fator de transcrição NF$\kappa$B, também chamado de fator de transformação RelA. **(b)** Não. Você pode obter resultados semelhantes, mas com as proteínas relacionadas adicionais listadas. **(c)** A proteína tem duas subunidades. Existem múltiplas variantes das subunidades, das quais as mais bem caracterizadas são as de 50, 52 ou 65 kDa. Elas pareiam umas com as outras e formam uma grande variedade de homodímeros e heterodímeros. As estruturas de diversas variantes podem ser encontradas no PDB. **(d)** O fator de transcrição NF$\kappa$B é um dímero que se liga a sequências específicas de DNA, intensificando a transcrição dos genes próximos. Um desses genes codifica a cadeia leve $\kappa$ da hemoglobina, de onde se originou o nome do fator.

**16.** **(a)** Aba é um substituto adequado para Cys, porque ambos têm cadeias laterais com aproximadamente o mesmo tamanho e são igualmente hidrofóbicos. Contudo, Aba não forma pontes dissulfeto e assim não será um substituto adequado se essas forem requeridas. **(b)** Existem muitas diferenças importantes entre a proteína sintetizada e a protease de HIV produzida por uma célula humana, cada uma delas pode resultar em uma enzima sintética inativa: (1) Apesar de Aba e Cys terem tamanhos e hidrofobicidades semelhantes, Aba pode não ser semelhante o suficiente para que a proteína se enovele corretamente. (2) A protease de HIV pode requerer pontes dissulfeto para um funcionamento adequado. (3) Muitas proteínas sintetizadas nos ribossomos se dobram à medida que são produzidas; a proteína deste estudo se dobrou somente depois que a cadeia estava completa. (4) As proteínas sintetizadas nos ribossomos podem interagir com eles à medida que se dobram; isso não é possível no caso da proteína em estudo. (5) O citosol é uma solução mais complexa do que o tampão usado no estudo; algumas proteínas podem requerer outras proteínas específicas desconhecidas para o enovelamento correto. (6) As proteínas sintetizadas nas células com frequência requerem chaperonas para o enovelamento correto; essas não estão presentes no tampão do estudo. (7) Nas células, a protease de HIV é sintetizada como parte de uma cadeia mais longa que é processada proteoliticamente; a proteína do estudo foi sintetizada como uma molécula simples. **(c)** Uma vez que a enzima é funcional com a substituição de Cys por Aba, as pontes dissulfeto não têm papel importante na estrutura da protease. **(d)** *Modelo 1:* ela vai se enovelar como a L-protease. *Argumento a favor:* a estrutura covalente é a mesma (exceto pela quiralidade), assim ela deve se enovelar como a L-protease. *Argumento contra:* a quiralidade não é um detalhe trivial; a forma tridimensional é uma característica-chave das moléculas biológicas. A enzima sintética não se enovelará como a L-protease. *Modelo 2:* ela vai se enovelar como a imagem especular da L-protease. *A favor:* uma vez que os componentes individuais são imagens especulares daqueles da proteína nativa, ela se enovelará com essa forma. *Contra:* as interações envolvidas no enovelamento de uma proteína são muito complexas, assim é mais provável que a proteína sintética se enovele de outra forma. *Modelo 3:* ela se enovelará de outra forma. *A favor:* as interações envolvidas no enovelamento de uma proteína são muito complexas, assim é mais provável que a proteína sintética se dobre de outra forma. *Contra:* uma vez que os componentes individuais são imagens especulares daqueles da proteína nativa, ela se dobrará com essa forma. **(e)** *Modelo 1:* a enzima é ativa, mas só com a forma enantiômera do substrato natural, e é inibida pela forma enantiômera do inibidor natural. Isso é consistente com a ideia de a D-protease ser a imagem especular da L-protease. **(f)** O azul de Evans é não quiral; ele se liga a ambas as formas da enzima. **(g)** Não. Uma vez que as proteases contêm somente L-aminoácidos e reconhecem somente L-peptídeos, a quimotripsina não vai digerir a D-protease. **(h)** Não necessariamente. Dependendo da enzima, qualquer um dos problemas listados em (b) poderá resultar em uma enzima inativa.

## Capítulo 5

**1.** A proteína B tem maior afinidade pelo ligante X; ela estará meio saturada com uma concentração de X muito mais baixa do que a proteína A. A proteína A tem um $K_a = 10^6$ M$^{-1}$; a proteína B tem um $K_a = 10^9$ M$^{-1}$.

**2.** **(a)**, **(b)** e **(c)** têm $n_H < 1{,}0$. A cooperatividade negativa aparente na interação com o ligante pode ser causada pela presença de dois, ou mais, sítios de interação com o ligante com afinidades diferentes pelo ligante, na mesma proteína ou em diferentes proteínas na mesma solução. A cooperatividade negativa aparente é comumente observada também nas preparações proteicas heterogêneas. Existem poucos casos documentados de cooperatividade negativa verdadeira.

**3.** **(a)** diminui **(b)** aumenta **(c)** diminui **(d)** aumenta

**4.** $k_d = 8{,}9 \times 10^{-5}$ s$^{-1}$.

**5.** **(a)** 0,5 nM (atalho: $K_d$ é equivalente à concentração do ligante quando $\theta = 0{,}5$. **(b)** A proteína 2 tem a $K_d$ mais baixa.

**6.** O comportamento cooperativo da hemoglobina provém das interações entre as subunidades.

**7.** **(a)** A observação de que a hemoglobina A (HbA; materna) está cerca de 60% saturada quando a $pO_2$ for 4 kPa, enquanto a hemoglobina F (HbF; fetal) está mais de 90% saturada sob as mesmas condições fisiológicas, indica que a HbF tem maior afinidade pelo $O_2$ do que a HbA. **(b)** A maior afinidade da HbF pelo $O_2$ garante que o oxigênio fluirá na placenta, do sangue materno para o fetal. O sangue fetal se aproxima da saturação total onde a afinidade da HbA pelo $O_2$ é baixa. **(c)** A observação de que a curva de saturação da HbA pelo $O_2$ sofre maior inclinação após a ligação de BPG do que a HbF sugere que BPG se liga mais firmemente à HbA do que à HbF. A ligação diferencial do BPG às duas hemoglobinas pode determinar a diferença de afinidade pelo $O_2$.

**8.** **(a)** Hb Memphis **(b)** HbS, Hb Milwaukee, Hb Providence, possivelmente Hb Cowtown **(c)** Hb Providence.

**9.** **(a)** Mais firmemente. A incapacidade de formar tetrâmeros limita a cooperatividade dessas variantes, e a curva de ligação se torna mais hiperbólica. Além disso, o sítio de ligação ao BPG é destruído. A liga-

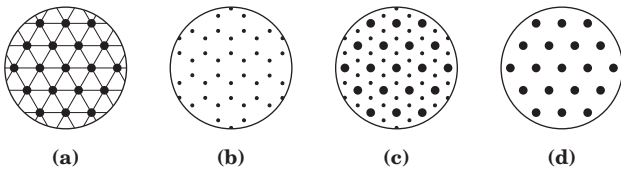
ção do oxigênio é, provavelmente, mais forte, porque o estado padrão na ausência de BPG é o estado R de ligação forte.

**10.** **(a)** $1 \times 10^{-8}$ M **(b)** $5 \times 10^{-8}$ M **(c)** $8 \times 10^{-8}$ M **(d)** $2 \times 10^{-7}$ M. Observe que um rearranjo da Equação 5-8 resulta em $[L] = \theta K_d/(1 - \theta)$.

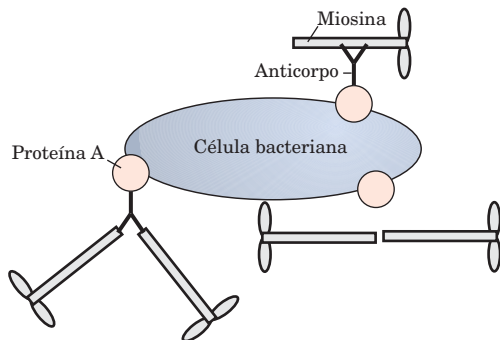
**11.** A estrutura do epítopo provavelmente fica escondida quando a G-actina polimeriza formando a F-actina.

**12.** Muitos patógenos, incluindo o HIV, têm mecanismos pelos quais conseguem alterar repetidamente as proteínas de superfície às quais os componentes do sistema imune se ligam. Assim, o organismo hospedeiro se defronta regularmente com novos antígenos e precisa de tempo para montar uma resposta imune para cada um deles. Enquanto o sistema imune responde a uma variante, são criadas novas variantes.

**13.** A ligação do ATP à miosina desencadeia sua dissociação do filamento fino da actina. Na ausência de ATP, actina e miosina se ligam firmemente uma à outra.

**14.**

**15.** **(a)** A cadeia L é a leve e a cadeia H é a pesada do fragmento Fab dessa molécula de anticorpo. A cadeia Y é a lisozima. **(b)** A estrutura $\beta$ predomina nas regiões variáveis e constantes do fragmento. **(c)** Cadeia pesada do fragmento Fab, 218 resíduos de aminoácidos; cadeia leve do fragmento, 214; lisozima, 129. Menos de 15% da molécula da lisozima está em contato com o fragmento Fab. **(d)** Na cadeia H, os resíduos que parecem estar em contato com a lisozima incluem $Gly^{31}$, $Tyr^{32}$, $Asp^{100}$ e $Tyr^{101}$. Na cadeia L, os resíduos que parecem estar em contato com a lisozima incluem $Tyr^{32}$, $Tyr^{49}$, $Tyr^{50}$ e $Trp^{92}$. Na lisozima, os resíduos $Asn^{19}$, $Gly^{22}$, $Tyr^{23}$, $Ser^{24}$, $Lys^{116}$, $Gly^{117}$, $Thr^{118}$, $Asp^{119}$, $Gln^{121}$ e $Arg^{125}$ parecem estar situados na interface antígeno-anticorpo. Nem todos esses resíduos estão adjacentes na estrutura primária. O enovelamento da cadeia polipeptídica em níveis estruturais mais elevados aproxima resíduos não consecutivos na formação do sítio antigênico de ligação.

**16.** **(a)** A proteína com um $K_d$ de 5 $\mu$M terá a afinidade mais alta pelo ligante L. Quando o $K_d$ for 10 $\mu$M, a duplicação de [L] de 0,2 para 0,4 $\mu$M (valores bem abaixo do $K_d$) irá praticamente duplicar o $\theta$ (o fator real de aumento é de 1,96). Essa é uma propriedade da curva hiperbólica; em baixas concentrações do ligante, $\theta$ é uma função quase linear da [L]. Por outro lado, a duplicação da [L] de 40 para 80 $\mu$M (bem acima do $K_d$, onde a curva de ligação se aproxima do seu limite assintótico) causará um aumento de $\theta$ por um fator de 1,1 somente. Os fatores de aumento são idênticos para as curvas geradas a partir da Equação 5-11. **(b)** $\theta = 0{,}998$. **(c)** Dependendo dos valores utilizados para os diferentes parâmetros, pode ser obtida uma grande variedade de respostas.

**17.** **(a)**

O desenho não está em escala; cada célula tem uma quantidade muito maior de moléculas de miosina na sua superfície. **(b)** O ATP é necessário para fornecer a energia química para impulsionar o movimento (ver Capítulo 13). **(c)** Um anticorpo que se ligue à cauda da miosina, o sítio de ligação da actina, bloqueará sua ligação e impedirá o movimento. Um anticorpo que se ligue à actina também impedirá a interação actina-miosina e, dessa forma, o movimento. **(d)** Existem duas explicações possíveis: (1) A tripsina atua somente nos resíduos Lys e Arg (ver Tabela 3-6) e assim não atuará sobre muitos sítios na proteína. (2) Nem todos os resíduos de Arg ou Lys são igualmente acessíveis à tripsina; os sítios mais expostos serão clivados em primeiro lugar. **(e)** O modelo S1. O modelo da dobradiça prevê que o complexo esfera-anticorpo-HMM (com a dobradiça) se mova, mas o complexo esfera-anticorpo-SHMM (sem a dobradiça) não se mova. O modelo S1 prevê que ambos se movam porque ambos os complexos incluem S1. A constatação que as esferas se movem com SHMM (sem dobradiça) é consistente somente com o modelo S1. **(f)** Com menos moléculas de miosina ligadas, as esferas podem temporariamente desprender-se da actina à medida que uma miosina se solta dela. As esferas então se movem mais lentamente, já que é necessário tempo para que uma segunda miosina se ligue. Em densidades mais altas de miosina, à medida que uma miosina se desprende, outra rapidamente se liga, gerando um movimento mais rápido. **(g)** Acima de certa densidade, o que limita a velocidade do movimento é a rapidez intrínseca com que a miosina move as esferas. As moléculas de miosina estão se movendo com a velocidade máxima e a adição de mais miosina não aumentará a velocidade. **(h)** Uma vez que a força é exercida na cabeça de S1, danos nessa região inativariam a molécula resultante, e a SHMM seria incapaz de produzir movimento. **(i)** A cabeça de S1 deve ser mantida íntegra por interações não covalentes suficientemente fortes para manter a forma ativa da molécula.

## Capítulo 6

**1.** A atividade da enzima que converte açúcar em amido é destruída por desnaturação térmica.

**2.** $2{,}4 \times 10^{-6}$ M.

**3.** $9{,}5 \times 10^{8}$ anos.

**4.** O complexo enzima-substrato é mais estável do que a enzima sozinha.

**5.** **(a)** 190 Å **(b)** O enovelamento tridimensional da enzima aproxima resíduos de aminoácidos.

**6.** A velocidade da reação pode ser medida pela redução na absorção por NADH (a 340 nm) à medida que a reação acontece. Determine o valor de $K_m$; usando uma concentração de substrato bem acima do $K_m$, meça a velocidade inicial (velocidade de desaparecimento de NADH com o tempo, medida espectrofotometricamente) em várias concentrações conhecidas da enzima, e desenhe uma curva de velocidade inicial *versus* concentração da enzima. A curva deve ser linear com uma inclinação que fornece a medida da concentração da LDH.

**7.** (b), (e), (g)

**8.** **(a)** $1{,}7 \times 10^{-3}$ M **(b)** 0,33; 0,67; 0,91 **(c)** A curva superior corresponde à enzima B ($[X] > K_m$ para esta enzima); a curva inferior, enzima A.

**9.** **(a)** 400 $s^{-1}$ **(b)** 10 $\mu$M **(c)** $\alpha = 2$, $\alpha' = 3$ **(d)** Inibidor misto

**10.** **(a)** 24 nM **(b)** 4 $\mu$M ($V_0$ é exatamente a metade de $V_{máx}$, assim $[A] = K_m$) **(c)** 40 $\mu$M ($V_0$ é exatamente a metade de $V_{máx}$, assim [A] = 10 vezes o $K_m$ na presença do inibidor) **(d)** Não. $k_{cat}/K_m = (0{,}33\ s^{-1})/(4 \times 10^{-6}\ M) = 8{,}25 \times 10^{-4} M^{-1}s^{-1}$, bem abaixo do limite de difusão controlada.

**11.** $V_{máx} \approx 140$ $\mu$M/min; $K_m \approx 1 \times 10^{-5}$ M.

**12.** **(a)** $V_{máx} = 51{,}5$ mM/min, $K_m = 0{,}59$ mM **(b)** Inibição competitiva.

**13.** $K_m = 2{,}2$ mM; $V_{máx} = 0{,}50$ $\mu$mol/min.

**14.** Curva A.

**15.** $k_{cat} = 2{,}0 \times 10^{7}\ min^{-1}$.

**16.** A hipótese básica da equação de Michaelis-Menten ainda persiste. A reação está no estado estacionário, e a velocidade é determinada por $V_0 = k_2$ [ES]. As equações a serem resolvidas para a [ES] são

$$[E_t] = [E] + [ES] + [EI] \quad \text{e} \quad [EI] = \frac{[E][I]}{K_I}$$

[E] pode ser obtida pelo rearranjo da Equação 6-19. O restante segue o padrão da dedução da equação de Michaelis-Menten no texto.

**17.** $M_r$ mínima = 29.000.

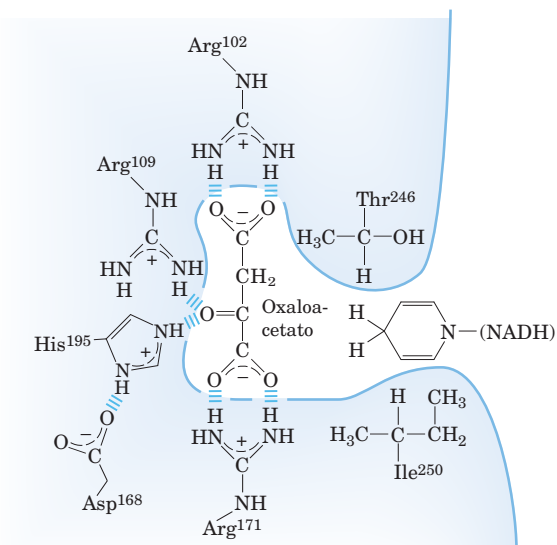
**18.** A atividade da enzima prostática é igual à atividade total de fosfatase na amostra de sangue descontando a atividade da enzima não inibida por tartarato, pois o tartarato inibe completamente a fosfatase ácida da próstata.

**19.** A inibição é mista. Uma vez que o $K_m$ parece não se alterar apreciavelmente, esse pode ser o caso especial de inibição mista denominada não competitiva.

**20.** A [S] na qual $V_0 = V_{máx}/2\alpha'$ é obtida quando todos os termos do lado direito da Equação 6-30, exceto $V_{máx}$ – isto é, $[S]/(\alpha K_m + \alpha'[S])$ –, se igualem a ½ $\alpha'$. Comece com $[S]/(\alpha K_m + \alpha'[S]) = ½\, \alpha'$ e encontre o valor de [S].

**21.** A atividade ótima ocorre quando $Glu^{35}$ está protonado e $Asp^{52}$ não está protonado.

**22.** **(a)** Fator de incremento = 1,96; $V_0$ = 50 $\mu$M $s^{-1}$; fator de incremento = 1,048.
**(b)** Quando $\alpha$ = 2,0, a curva desvia para a direita já que o $K_m$ aumenta por um fator de 2. Quando $\alpha'$ = 3,0, a assíntota da curva (o $V_{máx}$) diminui por um fator de 3. Qaundo $\alpha$ = 2,0 e $\alpha'$ = 3,0, a curva aumenta acima da curva onde ambos $\alpha$ e $\alpha'$ = 1,0, devido a um declínio no $K_m$. No entanto, a assíntota é menor, porque $V_{máx}$ declina por um fator de 3. **(c)** Quando $\alpha$ = 2,0, a intersecção em $x$ se desloca para a direita. Quando $\alpha$ = 2,0 e $\alpha'$ = 3,0, a intersecção em $x$ se desloca para a esquerda.

**23.** **(a)** Na enzima do tipo selvagem**,** o substrato é mantido na posição por uma ligação de hidrogênio e uma interação de dipolo iônico entre a cadeia lateral carregada da $Arg^{109}$ e a carbonila polar do piruvato. Durante a catálise, a cadeia lateral da $Arg^{109}$ também estabiliza o estado de transição da carbonil polarizada. Na mutante, a ligação se reduz a apenas uma ligação de hidrogênio, a ligação ao substrato é mais fraca, a estabilização iônica do estado de transição se perde, e a atividade catalítica é reduzida. **(b)** Uma vez que Lys e Arg têm quase o mesmo tamanho e uma carga positiva similar, eles provavelmente têm propriedades muito semelhantes. Além disso, como o piruvato se liga à $Arg^{171}$ por uma interação iônica (provavelmente), uma mutação de Arg para Lys terá um efeito pequeno sobre a ligação do substrato. **(c)** O arranjo "bifurcado" alinha dois grupos positivamente carregados de resíduos de Arg com os oxigênios negativamente carregados do piruvato e facilita duas interações de ligação de hidrogênio e de dipolo iônico combinadas. Quando a Lys está presente, somente uma dessas interações é possível, reduzindo, assim, a força da interação. O posicionamento do substrato é menos preciso. **(d)** $Ile^{250}$ interage hidrofobicamente com o anel do NADH. Esse tipo de interação não é possível com a cadeia lateral hidrofílica da Gln. **(e)** A estrutura está mostrada a seguir.
**(f)** A enzima mutante rejeita o piruvato porque o grupo metil hidrofóbico do substrato não irá interagir com o grupo guanidino altamente hidrofílico da $Arg^{102}$. A mutante se liga ao oxaloacetato em virtude das interações iônicas fortes entre a cadeia lateral da $Arg^{102}$ e o grupo carboxil do oxaloacetato. **(g)** A proteína deve ser flexível o suficiente para acomodar o acréscimo de volume da cadeia lateral e o substrato maior.

## Capítulo 7

**1.** Com a redução do oxigênio da carbonila um grupo hidroxila, a característica química em C-1 e C-3 é a mesma; a molécula de glicerol não é quiral.

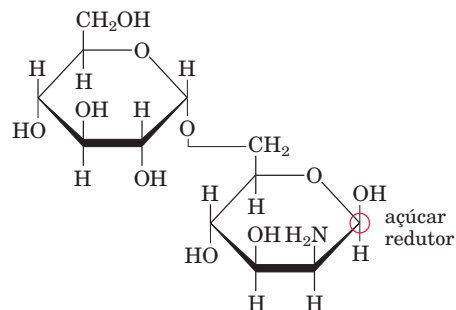
**2.** Epímeros diferem na configuração de apenas *um* carbono. **(a)** D-altrose (C-2), D-glicose (C-3), D-gulose (C-4) **(b)** D-idose (C-2), D-galactose (C-3), D-alose (C-4) **(c)** D-arabinose (C-2), D-xilose (C-3)

**3.** A formação de osazona destrói a configuração do C-2, de modo que as aldoses diferentes apenas na configuração do C-2 originam o mesmo derivado, com o mesmo ponto de fusão.

**4.** Para converter $\alpha$-D-glicose em $\beta$-D-glicose, quebra-se a ligação entre o C-1 e a hidroxila do C-5 (ver Figura 7-6). Para converter D-glicose em D-manose, quebra-se tanto a ligação de —H quanto a de —OH em C-2. A conversão entre as conformações em "cadeira" não requer o rompimento de ligações; essa é a distinção crucial entre configuração e conformação.

**5.** Não; a glicose e a galactose diferem em C-4.

**6.** **(a)** Ambos são polímeros de D-glicose, porém diferem quanto à ligação glicosídica: ($\beta$1→4) na celulose e ($\alpha$1→4) no glicogênio. **(b)** Ambas são hexoses, porém a glicose é uma aldo-hexose e a frutose é uma cetoexose. **(c)** Ambas são dissacarídeos, mas a maltose contém duas unidades de glicose ligadas ($\alpha$1→4); a sacarose contém D-glicose e D-frutose ligadas ($\alpha$1↔2$\beta$).

**7.**

**8.** Um hemiacetal é formado quando uma aldose ou cetose se condensa com um álcool; um glicosídeo é formado quando um hemiacetal se condensa com um álcool (ver Figura 7-5).

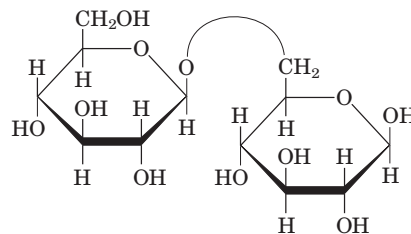
**9.** A frutose forma tanto a estrutura cíclica da piranose quanto a da furanose. O aumento da temperatura desloca o equilíbrio na direção da furanose, a forma menos doce.

**10.** A taxa de mutarrotação é alta o suficiente, de maneira que, conforme a enzima consome a $\beta$-D-glicose, mais $\alpha$- D-glicose é convertida à forma $\beta$ e, ao final, toda a glicose é oxidada. A glicose-oxidase é específica para a glicose e não detecta outros açúcares redutores (como a galactose), que reagem com o reagente de Fehling.

**11.** **(a)** A medida da variação da rotação óptica ao longo do tempo. **(b)** A rotação óptica da mistura é negativa (invertida) em relação àquela da solução de sacarose. **(c)** −2,0°.

**12.** Prepare uma pasta fluida de sacarose e água para o recheio, adicione uma pequena quantidade de sacarase (invertase) e imediatamente cubra com chocolate.

**13.** A sacarose não tem nenhum carbono anomérico livre para passar por mutarrotação.

**14.**

Sim. Sim

**15.** *N*-acetil-$\beta$-D-glicosamina é um açúcar redutor e seu C-1 pode ser oxidado (ver p. 252). D-gliconato não é um açúcar redutor e seu C-1 já está no estado de oxidação de um ácido carboxílico. GlcN($\alpha$1↔1$\alpha$) Glc não é um açúcar redutor e os carbonos anoméricos de ambos os monossacarídeos estão envolvidos na ligação glicosídica.

**16.** Os humanos carecem de celulase no intestino e não conseguem degradar a celulose.

**17.** A celulose nativa consiste em unidades de glicose ligadas por ligações glicosídicas ($\beta$1→4), as quais forçam a cadeia do polímero a assumir uma conformação estendida. As séries paralelas dessas cadeias estendidas formam ligações de hidrogênio intermoleculares, agregando-as em fibras longas, resistentes e insolúveis. O glicogênio consiste em unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas ($\alpha$1→4), o que leva a curvaturas na cadeia e impede a formação de fibras longas. Além disso, o glicogênio é extremamente ramificado e, já que muitos dos grupos hidroxila estão expostos à água, é altamente hidratado e se dispersa na água.

A celulose é um material estrutural em plantas, consistente com a agregação lateral em fibras insolúveis. O glicogênio é uma forma de armazenamento de combustível em animais. Grânulos de glicogênio altamente hidratados, com suas muitas extremidades não redutoras, são rapidamente hidrolisados pela glicogênio-fosforilase para a liberação de glicose-1-fosfato.

**18.** A celulose é algumas vezes mais extensa, assumindo uma conformação estendida, enquanto a amilose tem estrutura helicoidal.

**19.** 6.000 resíduos/s.

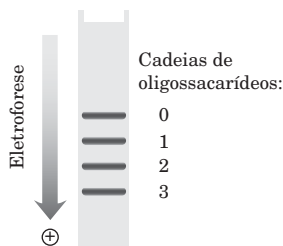
**20.** 11 s.

**21.** O modelo em esfera e bastão do dissacarídeo na Figura 7-18b não mostra as interações estéricas, porém, um modelo de volume atômico apresentando os átomos com seus tamanhos relativos reais iria expor alguns fortes impedimentos estéricos no confôrmero $-170°$, $-170°$, os quais não estão presentes no confôrmero $30°$, $-40°$.

**22.** As cargas negativas do sulfato de condroitina repelem umas às outras e forçam a molécula a uma conformação estendida. A polaridade da molécula atrai muitas moléculas de água, aumentando o volume molecular. No sólido desidratado, cada carga negativa é contrabalanceada por um íon positivo, e a molécula se comprime.

**23.** Resíduos de aminoácidos positivamente carregados se ligariam aos grupos da heparina carregados com alta carga negativa. Na verdade, resíduos de Lys da antitrombina III interagem com a heparina.

**24.** Oito sequências possíveis, 144 ligações possíveis e 64 possibilidades estereoquímicas, somando um total de 73.728 permutações!

**25.**

**26.** Oligossacarídeos, pois suas subunidades podem ser combinadas de mais maneiras diferentes do que as subunidades de aminoácidos dos oligopeptídeos. Cada grupo hidroxila pode participar das ligações glicosídicas, e a configuração de cada ligação glicosídica pode ser $\alpha$ ou $\beta$. O polímero pode ser linear ou ramificado.

**27.** **(a)** Resíduos em pontos de ramificação geram 2,3-di-*O*-metilglicose; os resíduos não ramificados geram 2,3,6-tri-*O*-metilglicose. **(b)** 3,75%.

**28.** Cadeias de resíduos de D-glicose ligadas (1→6) com ramificações (1→3) esporádicas, com aproximadamente uma ramificação a cada 20 resíduos.

**29.** **(a)** Os testes envolvem a tentativa da dissolução de apenas parte da amostra em diferentes solventes, e, então, a análise dos materiais dissolvidos e não dissolvidos para avaliar se as composições diferem. **(b)** Para uma substância pura, todas as moléculas são iguais e qualquer fração dissolvida apresentará a mesma composição da fração não dissolvida. Uma substância impura é uma mistura de mais de um componente. Quando tratado com um solvente específico, um dos componentes pode dissolver-se mais, deixando mais do outro componente para trás. Como resultado, as frações dissolvidas e não dissolvidas apresentam composições diferentes. **(c)** Um ensaio quantitativo permite que os pesquisadores estejam seguros que nada da atividade seja perdido por degradação. Ao se determinar a estrutura de uma molécula, é importante que a amostra sob análise seja constituída somente por moléculas intactas (não degradadas). Se a amostra estiver contaminada com material degradado, os resultados estruturais confusos possivelmente serão não interpretáveis. Um ensaio qualitativo detectaria a presença de atividade, mesmo que a amostra estivesse significativamente degradada. **(d)** Resultados 1 e 2. O resultado 1 é consistente com a estrutura conhecida, pois o antígeno tipo B tem três moléculas de galactose, enquanto os tipos A e O têm apenas dois resíduos cada. O resultado 2 também é consistente, pois o tipo A tem dois aminoaçúcares (*N*-acetilgalactosamina e *N*-acetilglicosamina), enquanto os tipos B e O têm apenas um (*N*-acetilglicosamina). O resultado 3 *não* é consistente com a estrutura conhecida: para o tipo A, a razão glicosamina:galactosamina é 1:1; para o tipo B, ela é 1:0. **(e)** As amostras estavam provavelmente impuras e/ou parcialmente degradadas. Os primeiros dois resultados estavam corretos possivelmente porque o método era somente semiquantitativo e, portanto, não tão sensível a imprecisões na dosagem. O terceiro resultado é mais quantitativo e, por isso, provavelmente difere dos valores previstos, devido a amostras impuras ou degradadas. **(f)** Exoglicosidase. Se fosse endoglicosidase, um dos produtos de sua ação sobre o antígeno O seria galactose, *N*-acetilglicosamina ou *N*-acetilgalactosamina, e pelo menos um desses açúcares seria capaz de inibir a degradação. Dado que a enzima não é inibida por nenhum desses açúcares, ela deve ser uma exoglicosidase, removendo somente o açúcar terminal da cadeia. O açúcar terminal do antígeno O é a fucose, a qual corresponde, portanto, ao único açúcar que poderia inibir a degradação do antígeno O. **(g)** A exoglicosidase remove a *N*-acetilgalactosamina do antígeno A e a galactose do antígeno B. Como a fucose não é produto de nenhuma dessas reações, ela não impede a remoção desses açúcares, e as moléculas resultantes não mais serão antígenos A ou B ativos. Entretanto, os produtos deveriam ser ativos sobre o antígeno O, pois a degradação para na fucose. **(h)** Todos os resultados são consistentes com a Figura 10-15. (1) D-Fucose e L-galactose, que protegeriam contra a degradação, não estão presentes em nenhum dos antígenos. (2) O açúcar terminal do antígeno A é *N*-acetilgalactosamina, e esse é o único açúcar capaz de proteger esse antígeno da degradação. (3) O açúcar terminal do antígeno B é a galactose, único açúcar capaz de proteger esse antígeno.

## Capítulo 8

**1.** N-3 e N-7

**2.** (5′)GCGCAATATTTTGAGAAATATTGCGC(3′), e contém um palíndromo. A cadeia individual pode formar estruturas de grampo e as duas cadeias podem formar uma estrutura cruciforme.

**3.** $9{,}4 \times 10^{-4}$ g.

**4.** **(a)** 40° **(b)** 0°.

**5.** A hélice de RNA está na conformação A; a hélice de DNA está geralmente na conformação B.

**6.** No DNA de eucariotos, aproximadamente 5% dos resíduos de C estão metilados. A 5-metilcitosina pode ser desaminada espontaneamente para formar timina; o par G–T resultante é um dos pareamentos incorretos mais comuns em células eucarióticas.

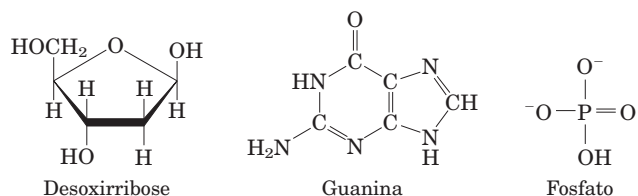
**7.** Mais alto.

**8.** Sem a base, o anel de ribose pode ser aberto para gerar a forma aldeídica não cíclica. Isso, e a perda de interações de empilhamento de bases, podem contribuir significativamente para a flexibilidade do esqueleto de DNA.

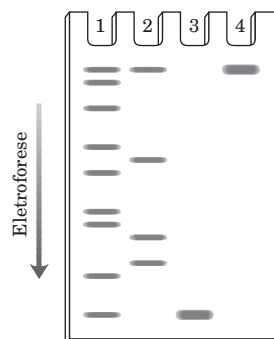
**9.** CGCGCGTGCGCGCGCG.

**10.** O empilhamento de bases em ácidos nucleicos tende a reduzir a absorção de luz UV. A desnaturação envolve perda de empilhamento de bases e aumento de absorção da UV.

**11.** 0,35 mg/mL.

**12.**

Solubilidades: fosfato > desoxirribose > guanina. Os grupos fosfato altamente polares e as porções de açúcar estão na parte externa da hélice dupla, expostos à água; as bases hidrofóbicas estão no interior da hélice.

**13.** Se dCTP for omitido, quando o primeiro resíduo de G for encontrado no molde, será adicionado ddCTP, e a polimerização será interrompida. Somente uma banda será visualizada no gel de sequenciamento.

**14.**

**15.** (5′)P—GCGCCAUUGC(3′)—OH
(5′)P—GCGCCAUUG(3′)—OH
(5′)P—GCGCCAUU(3′)—OH
(5′)P—GCGCCAU(3′)—OH
(5′)P—GCGCCA(3′)—OH
(5′)P—GCGCC(3′)—OH
(5′)P—GCGC(3′)—OH
(5′)P—GCG(3′)—OH
(5′)P—GC(3′)—OH
e os nucleosídeos 5′-fosfato.

**16.** **(a)** A água participa da maioria das reações biológicas, incluindo as que causam mutações. O baixo conteúdo de água nos endósporos reduz a atividade de enzimas causadoras de mutações e a taxa de reações não enzimáticas de depurinação (reações de hidrólise). **(b)** A luz UV induz a formação de dímeros de pirimidina ciclobutano. Como *B. subtilis* é um organismo do solo, os esporos podem ir para a superfície do solo ou para o ar, onde podem sujeitar-se à exposição prolongada aos raios UV.

**17.** DMT é um grupo bloqueador que impede a reação da base que está sendo adicionada com ela mesma.

**18.** **(a)** Orientada para a direita. A base em uma extremidade 5′ é a adenina; na outra extremidade 5′ é a citidina. **(b)** Orientada para a esquerda. **(c)** Se não conseguir ver as estruturas tridimensionalmente, use o a ferramenta de busca para encontrar dicas *on-line*.

**19.** **(a)** Não é fácil! Esses dados para amostras diferentes do mesmo organismo demonstram variações significativas e o rendimento nunca é 100%. Os números para C e T têm muito mais consistência do que aqueles para A e G, então para C e T é muito mais fácil defender a ideia de que amostras do mesmo organismo têm a mesma composição. Mas mesmo com valores menos consistentes para A e G, (1) a faixa de valores para diferentes tecidos se sobrepõe substancialmente; (2) a divergência entre diferentes preparações do mesmo tecido é aproximadamente a mesma entre amostras de diferentes tecidos; e (3) em amostras para as quais o rendimento é alto, os números são mais consistentes. **(b)** Essa técnica não seria sensível o suficiente para detectar uma diferença entre células normais e cancerígenas. Câncer é causado por mutações, mas essas alterações no DNA – poucos pares de bases em vários bilhões – seriam muito pequenas para serem detectadas por essas técnicas. **(c)** As relações A:G e T:C variam muito entre diferentes espécies. Por exemplo, na bactéria *Serratia marcescens*, ambas as razões são de 0,4, mostrando que o DNA é principalmente composto por G e C. Na *Haemophilus influenzae*, por outro lado, as razões são de 1,74 e 1,54, então o DNA é principalmente A e T. **(d)** A conclusão 4 tem três exigências: A = T: a tabela mostra uma razão A:T muito próxima a 1 em todos os casos. Certamente, a variação dessa razão é muito menor do que a variação nas razões A:G e T:C. G = C: Novamente, a razão G:C é muito próxima a 1 e outras razões variam amplamente. (A + G) = (T + C): Essa é a razão purina:pirimidina, a qual também é muito próxima a 1. **(e)** As frações diferentes do "cerne" representam diferentes regiões do DNA do germe de trigo. Se o DNA fosse uma sequência repetitiva monótona, a composição de bases de todas as regiões seria a mesma. Uma vez que regiões diferentes do cerne têm sequências diferentes, a sequência de DNA deve ser mais complexa.

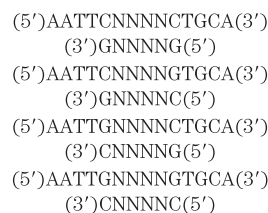
## Capítulo 9

**1.** **(a)** (5′) – – – G(3′) e (5′)AATTC – – – (3′)
(3′) – – – CTTAA(5′) (3′)G – – – (5′)
**(b)** (5′) – – – GAATT(3′) e (5′)AATTC – – – (3′)
(3′) – – – CTTAA(5′) (3′)TTAAG – – – (5′)
**(c)** (5′) – – – GAATTAATTC – – – (3′)
(3′) – – – CTTAATTAAG – – – (5′)
**(d)** (5′) – – – G(3′) e (5′)C – – – (3′)
(3′) – – – C(5′) (3′)G – – – (5′)
**(e)** (5′) – – – GAATTC – – – (3′)
(3′) – – – CTTAAG – – – (5′)
**(f)** (5′) – – – CAG(3′) e (5′)CTG – – – (3′)
(3′) – – – GTC(5′) (3′)GAC – – – (5′)
**(g)** (5′) – – – CAGAATTC – – – (3′)
(3′) – – – GTCTTAAG – – – (5′)

**(h)** Método 1: clivar o DNA com *Eco*RI como em (a). Nesse ponto, trata-se o DNA como em (b) ou (d), então ligar um fragmento de DNA sintético com sequência de reconhecimento da enzima *Bam*HI entre as duas extremidades cegas resultantes. Método 2 (mais eficiente): sintetizar um fragmento de DNA com a estrutura

(5′)AATTGGATCC(3′)
(3′)CCTAGGTTAA(5′)

Esse fragmento se liga de modo eficiente a extremidades coesivas geradas pela clivagem com *Eco*RI, realizaria a introdução de um sítio de *Bam*HI, mas não regeneraria o sítio de *Eco*RI. **(i)** Os quatro fragmentos (sendo N = qualquer nucleotídeo), na ordem de discussão do problema, são:

(5′)AATTCNNNNCTGCA(3′)
(3′)GNNNNG(5′)
(5′)AATTCNNNNGTGCA(3′)
(3′)GNNNNC(5′)
(5′)AATTGNNNNCTGCA(3′)
(3′)CNNNNG(5′)
(5′)AATTGNNNNGTGCA(3′)
(3′)CNNNNC(5′)

**2.** O DNA do fago λ pode ser empacotado em partículas infecciosas de fagos somente se o seu tamanho estiver compreendido entre 40.000 e 53.000 pares de bases de comprimento. Uma vez que vetores bacteriófagos geralmente têm acima de 30.000 pares de bases (em duas partes), ele não será empacotado em partículas de fagos a menos que ele contenha um fragmento de DNA de comprimento adequado inserido (10.000 a 23.000 pares de bases).

**3.** **(a)** Plasmídeos nos quais o plasmídeo original pBR322 foi regenerado sem inserção de fragmento de DNA exógeno. Esses vetores possuem resistência a ampicilina. Duas ou mais moléculas de pBR322 também poderiam ser ligadas juntas com ou sem a inserção de DNA exógeno. **(b)** Os clones nas canaletas 1 e 2 têm um fragmento de DNA inserido em diferentes orientações. O clone na canaleta 3 tem dois fragmentos de DNA, ligados de forma tal que as extremidades proximais de *Eco*RI estão unidas.

**4.** (5′) GAAAGTCCGCGTTATAGGCATG(3′)
(3′)ACGTCTTTCAGGCGCAATATCCGTACTTAA(5′)

**5.** O seu teste necessitaria de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) de DNA, uma DNA-polimerase termoestável, desoxirribonucleosídeos trifosfatados e uma máquina de PCR (termociclador). Os oligonucleotídeos iniciadores são desenhados para amplificar um segmento de DNA compreendendo a repetição CAG. A fita de DNA mostrada é a fita codificadora, orientada de 5′→3′ da esquerda para a direita. O iniciador que se liga ao DNA à esquerda da repetição é idêntico para qualquer sequência de 25 nucleotídeos mostrada na região à esquerda da repetição CAG. O iniciador que se liga ao lado direito deve ser *complementar* e *antiparalelo* à sequência de 25 nucleotídeos à direita da repetição CAG. Usando esses iniciadores, O DNA contendo a repetição CAG seria amplificado por PCR, e o seu tamanho seria determinado por comparação com marcadores de peso molecular após eletroforese. O tamanho do DNA refletiria o número de repetições CAG, fornecendo um teste simples para o diagnóstico da doença.

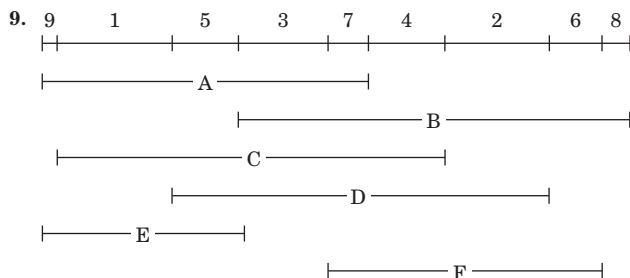
**6.** Desenhar oligonucleotídeos iniciadores para PCR complementares para o segmento de DNA eliminado, mas o qual direcionaria a síntese de DNA distante uma da outra. Nenhum produto de PCR será gerado a menos que as extremidades do segmento eliminado estejam unidas para criar um círculo.

**7.** A planta expressando a luciferase do vagalume deverá captar a luciferina, o substrato da luciferase, antes de poder "brilhar" (embora fracamente). A planta expressando a proteína fluorescente verde brilha sem necessitar de nenhum outro composto.

**8.** Iniciador 1: CCTCGAGTCAATCGATGCTG

Iniciador 2: CGCGCACATCAGACGAACCA

Recorde que todas as sequências de DNA são sempre escritas no sentido 5′ para 3′, da esquerda para a direita; que as duas fitas de uma molécula de DNA são antiparalelas; e que ambos os iniciadores de PCR devem dirigir as sequências terminais de forma que suas extremidades 3′ sejam orientadas para o segmento a ser amplificado. No laboratório, escrever uma sequência na orientação errada em um formulário de pedido de um oligonucleotídeo iniciador sintético pode ser um erro muito caro.

**9.**

**10.** A produção de anticorpos marcados é muito cara e difícil. A marcação de cada anticorpo para cada proteína-alvo é impraticável. A marcação de uma preparação de anticorpo para que se ligue a todos os anticorpos de uma classe em particular permite que a mesma preparação possa ser usada em muitos experimentos de imunofluorescência diferentes.

**11.** Expresse a proteína na linhagem 1 de levedura como proteína de fusão com um dos domínios de Gal4p – por exemplo, o domínio de ligação ao DNA. Usando a linhagem 2 de levedura, faça uma biblioteca na qual todas as proteínas do fungo sejam expressas como proteínas de fusão com o domínio de interação Gal4p. Cruze a biblioteca da linhagem 1 com a da linhagem 2, e procure as colônias coloridas pela expressão do gene repórter. Essas colônias geralmente surgem de células que contêm uma proteína de fusão que interage com sua proteína-alvo.

**12.** Cobrir a mancha 4, adicionar solução contendo T ativado, irradiar e lavar

1. A–T 2. G–T 3. A–T 4. G–C

Cobrir as manchas 2 e 4, adicionar solução contendo G ativado, irradiar e lavar

1. A–T–G 2. G–T 3. A–T–G 4. G–C

Cobrir a mancha 3, adicionar solução contendo C ativado, irradiar e lavar

1. A–T–G–C 2. G–T–C 3. A–T–G 4. G–C–C

Cobrir as manchas 1, 3 e 4, adicionar solução contendo C ativado, irradiar e lavar

1. A–T–G–C 2. G–T–C–C 3. A–T–G 4. G–C–C

Cobrir as manchas 1 e 2, adicionar solução contendo G ativado, irradiar e lavar

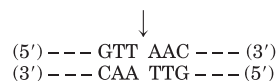
1. A–T–G–C 2. G–T–C–C 3. A–T–G–C 4. G–C–C–C

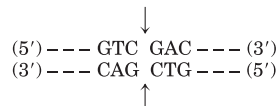
**13.** Os iniciadores podem ser usados para sondar bibliotecas contendo clones genômicos longos para identificar as extremidades dos contigs próximos. Se os contigs que flanqueiam os espaços estiverem suficientemente próximos, os iniciadores podem ser usados em uma PCR para amplificar diretamente o DNA de interferência que separa os contigs, que podem então ser clonados e sequenciados.

**14.** ATSAAG**W**DEWEGGK**V**LIHL**DG**KLQNRGALLELDIGAV

**15.** A mesma doença pode ser causada por defeitos em dois ou mais genes, que estão em cromossomos diferentes.

**16.** **(a)** As soluções de DNA são altamente viscosas porque contêm um conjunto de moléculas muito grandes e emaranhadas em solução. Moléculas pequenas tendem a ser menos emaranhadas e formar uma solução menos viscosa; dessa forma, uma diminuição da viscosidade corresponde a um encurtamento do polímero – como o causado pela atividade nucleásica. **(b)** Uma endonuclease. Uma exonuclease remove nucleotídeos de extremidades 5′ e 3′ e poderia produzir nucleotídeos marcados com $^{32}$P solúveis em TCA. Uma endonuclease corta o DNA em fragmentos de oligonucleotídeos e produz pouco ou nenhum material marcado com $^{32}$P solúvel em TCA. **(c)** A extremidade 5′. Se o fosfato estivesse à esquerda na extremidade 3′, a cinase incorporaria uma quantidade significativa de $^{32}$P como o fosfato acrescido à extremidade 5′. O tratamento com fosfatase não teria nenhum efeito sobre isso. Nesse caso, as amostras A e B incorporariam quantidades significantes de $^{32}$P. Quando o fosfato está à esquerda na extremidade 5′, a cinase não promove nenhuma incorporação de $^{32}$P: ela não pode adicionar fosfato quando esse grupamento já está presente. O tratamento com fosfatase remove o fosfato da posição 5′, e a cinase, então, incorpora quantidades significativas de $^{32}$P. A amostra A terá pouco ou nenhum $^{32}$P, e a B mostrará incorporação substancial de $^{32}$P – como observado. **(d)** As quebras aleatórias iriam produzir uma distribuição de fragmentos de tamanhos aleatórios. A produção de fragmentos específicos indica que a enzima é sítio-específica. **(e)** Clivagem no sítio de reconhecimento. Isso produz uma sequência específica na extremidade 5′dos fragmentos. Se a clivagem ocorresse próxima, mas não dentro do sítio de reconhecimento, as sequências das extremidades 5′ dos fragmentos seriam aleatórias. **(f)** Os resultados são consistentes com duas sequências de reconhecimento, como mostradas a seguir, clivadas onde mostrado pelas setas:

```
              ↓
(5′) – – – GTT  AAC – – – (3′)
(3′) – – – CAA  TTG – – – (5′)
              ↑
```

Que produz os fragmentos (5′)pApApC e (3′)TpTp; e

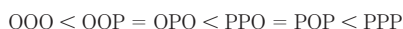
```
              ↓
(5′) – – – GTC  GAC – – – (3′)
(3′) – – – CAG  CTG – – – (5′)
              ↑
```

Que produz os fragmentos (5′)pGpApC e (3′)CpTp.

## Capítulo 10

**1.** O termo "lipídeo" não especifica uma estrutura química particular. Os compostos são classificados como lipídeos com base na sua maior solubilidade nos solventes orgânicos do que na água.

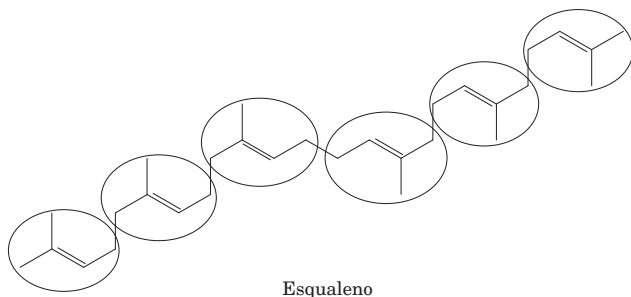
**2.** **(a)** O número de ligações duplas *cis*. Cada ligação dupla *cis* causa uma inflexão na cadeia hidrocarbonada, baixando a temperatura de

fusão. **(b)** Seis triacilgliceróis diferentes podem ser construídos, em ordem crescente de pontos de fusão:

$$OOO < OOP = OPO < PPO = POP < PPP$$

Nos quais O = ácido oleico e P = ácido palmítico. Quanto maior o conteúdo em ácido graxo saturado, mais alto é o ponto de fusão. **(c)** Os ácidos graxos com cadeias ramificadas aumentam a fluidez da membrana porque reduzem o grau de empacotamento dos lipídeos da membrana.

**3.** A lecitina, composto anfipático, é um agente emulsificante, facilitando a solubilização da manteiga.

**4.**

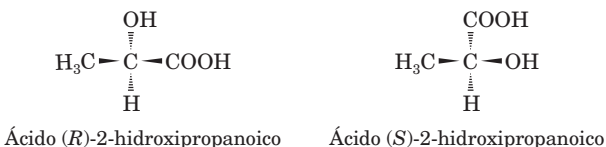
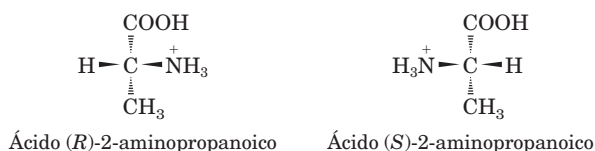
Esqualeno

**5.** A hortelã é (*R*)-carvona; a alcaravia é (*S*)-carvona.

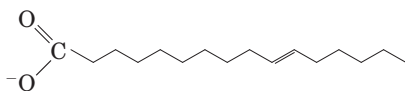
**6.**

COOH, H, $\overset{+}{N}H_3$, $CH_3$ — Ácido (*R*)-2-aminopropanoico

COOH, $H_3\overset{+}{N}$, H, $CH_3$ — Ácido (*S*)-2-aminopropanoico

OH, $H_3C$, COOH, H — Ácido (*R*)-2-hidroxipropanoico

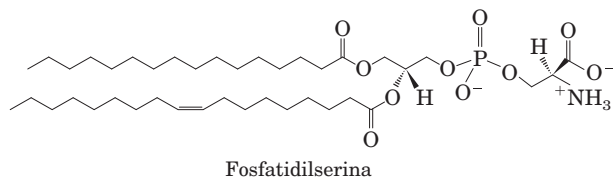
COOH, $H_3C$, OH, H — Ácido (*S*)-2-hidroxipropanoico

**7.** *Unidades hidrofóbicas:* (a) 2 ácidos graxos; (b), (c) e (d) 1 ácido graxo e a cadeia hidrocarbonada da esfingosina; (e) núcleo esteroide e cadeia lateral acil. *Unidades hidrofílicas:* (a) fosfoetanolamina; (b) fosfocolina; (c) D-galactose; (d) várias moléculas de açúcar; (e) grupo álcool (OH).

**8.**

**9.** Pela redução das ligações duplas, o que eleva o ponto de fusão dos lipídeos que contêm os ácidos graxos.

**10.** Os triacilgliceróis das gorduras animais (banha) são hidrolisados (saponificados) pelo NaOH e formam sabões muito mais solúveis em água do que os triacilgliceróis.

**11.** Só pode ser um esfingolipídeo (esfingomielina).

**12.**

Fosfatidilserina

**13.** Cadeias acil longas e saturadas, quase sólidas na temperatura ambiente, formam uma camada hidrofóbica, na qual compostos polares como a $H_2O$ não conseguem se dissolver ou difundir.

**14.** **(a)** O grupo —OH livre no C-2 e o grupo polar fosfocolina no C3 são hidrofílicos; o ácido graxo no C-1 da lisolecitina é hidrofóbico. **(b)** Certos esteroides como a prednisona inibem a atividade da fosfolipase $A_2$, inibindo, assim, a liberação de ácido araquidônico a partir de C-2. O ácido araquidônico se converte em uma grande variedade de eicosanoides, sendo que alguns deles causam inflamação e dor. **(c)** A fosfolipase $A_2$ libera ácido araquidônico, precursor de outros eicosanoides que têm função de proteção no corpo; ela também degrada glicerofosfolipídeos da dieta.

**15.** A parte lipídica da membrana que determina o tipo sanguíneo é o oligossacarídeo do grupo polar dos esfingolipídeos (ver Figura 10-15). Esse mesmo oligossacarídeo está ligado a determinadas glicoproteínas de membrana, as quais também servem como ponto de reconhecimento pelos anticorpos que distinguem grupos sanguíneos.

**16.** O diacilglicerol é hidrofóbico e permanece na membrana. O inositol 1,4,5-trifosfato é altamente polar, muito solúvel em água e se difunde facilmente no citosol. Ambos são segundos mensageiros.

**17.** As vitaminas hidrossolúveis são excretadas mais rapidamente na urina e não são armazenadas. As vitaminas lipossolúveis têm solubilidade muito baixa em água e são armazenadas nos lipídeos corporais.

**18.** **(a)** Glicerol e os sais sódicos dos ácidos palmítico e esteárico. **(b)** D-glicerol-3-fosfocolina e os sais sódicos dos ácidos palmítico e oleico.

**19.** Solubilidade em água: monoacilglicerol > diacilglicerol > triacilglicerol.

**20.** Do eluído em primeiro lugar ao eluído em último lugar: palmitato de colesteril e triacilglicerol; colesterol e *n*-tetradecanol; fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina; esfingomielina; fosfatidilserina e palmitato.

**21.** **(a)** Faça uma cromatografia (GLS, ou TLC em sílica gel) com os componentes de hidrolisados ácidos e compare os resultados com padrões conhecidos. *Hidrolisado de esfingomielina:* esfingosina, ácidos graxos, fosfocolina, colina e fosfato; *hidrolisado de cerebrosídeo:* esfingosina, ácidos graxos, açúcares, mas sem fosfato. **(b)** A hidrólise alcalina forte da esfingomielina gera esfingosina; fosfatidilcolina gera glicerol. Detecte os componentes do hidrolisado em cromatogramas de camada delgada comparando-os com padrões ou por sua reação diferencial com FDNB (somente a esfingosina reage e forma um composto colorido). O tratamento com fosfolipase $A_1$ ou $A_2$ libera ácidos graxos da fosfatidilserina, mas não da esfingomielina.

**22.** Fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina.

**23.** **(a)** GM1 e globosídeo. A glicose e a galactose são hexoses, de forma que "hexose" na relação molar se refere a glicose + galactose. As proporções para os quatro gangliosídeos são: GM1, 1:3:1:1; GM2, 1:2:1:1; GM3, 1:2:0:1; globosídeo, 1:3:1:0. **(b)** Sim. A proporção combina com GM2, o gangliosídeo esperado na doença de Tay-Sachs (ver Quadro 10-1, Figura Q-1) **(c)** Essa análise é semelhante à utilizada por Sanger para determinar a sequência de aminoácidos da insulina. A análise dos fragmentos revela somente sua *composição,* não sua *sequência,* mas como cada fragmento se origina da remoção sequencial de um açúcar, é possível tirar conclusões sobre a sequência. A estrutura do assialogangliosídeo normal é a ceramida – glicose-galactose-galactosamina-galactose – coerente com o Quadro 10-1 (excluindo Neu5Ac, removida antes da hidrólise). **(d)** O assialogangliosídeo de Tay-Sachs é ceramida-glicose-galactose-galactosamina, coerente com o Quadro 10-1 **(e)** A estrutura do assialogangliosídeo normal GM1 é: *ceramida-glicose* (2 —OH envolvidos em ligações glicosídicas; 1—OH envolvido na estrutura do anel; 3 —OH (2,3,6) livres para metilação)-*galactose* (2 —OH em ligações; 1 —OH no anel; 3 —OH (2,4,6) livres para metilação)-*galactosamina* (2 —OH em ligações; 1 —OH no anel; 1—$NH_2$ em vez de 1 —OH; 2 —OH (4,6) livres para metilação)-*galactose* (1 —OH na ligação; 1 —OH no anel; 4 —OH (2,3,4,6) livres para metilação) **(f)** Estão faltando duas informações-chave: quais são as ligações entre os açúcares? Onde o Neu5Ac está ligado?

## Capítulo 11

**1.** A área por molécula pode ser calculada a partir da quantidade usada e conhecida (número de moléculas) de lipídeos, e a área ocupada por uma monocamada quando começa a resistir à compressão (quando a força necessária aumenta muito, conforme mostra a curva de força *versus* área).

**2.** Os dados apoiam uma bicamada de lipídeos nos eritrócitos de cão: uma célula isolada com área de superfície de 98 $\mu m^2$ tem área de monocamada lipídica de 200 $\mu m^2$. No caso de eritrócitos humanos e de ovelhas, os dados sugerem uma monocamada, não uma bicamada. De fato, ocorreram erros experimentais significativos nesses primeiros experimentos; medidas recentes mais acuradas apoiam uma bicamada em todos os casos.

**3.** 63 moléculas de SDS por micela.

**4.** **(a)** Os lipídeos que formam bicamadas são moléculas anfipáticas: contêm uma região hidrofílica e uma região hidrofóbica. Esses lipídeos formam uma camada bidimensional com as regiões hidrofílicas expostas para a água e as regiões hidrofóbicas escondidas no interior da camada, para minimizar a área hidrofóbica exposta à superfície aquosa. Além disso, para evitar a exposição das bordas hidrofóbicas da camada à água, a bicamada lipídica se fecha sobre si mesma. **(b)** Essas camadas formam as superfícies fechadas de membranas que envolvem as células e os compartimentos intracelulares (organelas).

**5.** 2 nm. Dois palmitatos colocados com as extremidades em contato se estendem por 4 nm, aproximadamente a espessura de uma bicamada típica.

**6.** Redução. O movimento dos lipídeos individuais na bicamada ocorre muito mais rapidamente a 37ºC, quando estão na fase "fluida", do que a 10ºC, quando estão na fase "sólida".

**7.** 35 kJ/mol, omitindo os efeitos do potencial elétrico transmembrana; 0,60 mol.

**8.** 13 kJ/mol.

**9.** A maior parte do $O_2$ consumido nos tecidos é pela fosforilação oxidativa, a fonte da maioria do ATP. Portanto, dois terços do ATP sintetizado pelo rim são usados para bombear $K^+$ e $Na^+$.

**10.** Não. O simportador pode carregar mais do que um equivalente de $Na^+$ para cada mol de glicose transportado.

**11.** A extração com sal indica uma localização periférica, e a inacessibilidade a proteases em células intactas indica uma localização interna. A proteína X parece ser periférica na face citosólica da membrana.

**12.** As interações hidrofóbicas entre os lipídeos da membrana são não covalentes e reversíveis, permitindo o fechamento espontâneo da membrana.

**13.** A temperatura dos tecidos corporais nas extremidades é mais baixa do que daqueles mais próximos ao centro do corpo. Se os lipídeos devem permanecer fluidos nessa temperatura mais baixa, eles devem conter uma proporção mais elevada de ácidos graxos insaturados; os ácidos graxos insaturados baixam o ponto de fusão das misturas lipídicas.

**14.** O custo energético para mover os grupos altamente polares e às vezes carregados, pelo interior hidrofóbico da membrana, é proibitivo.

**15.** Em pH 7, o triptofano carrega uma carga positiva e uma negativa, mas o indol não tem carga. O movimento do indol menos polar pelo núcleo hidrofóbico da bicamada é energeticamente mais favorável.

**16.** $3 \times 10^{-2}$ s.

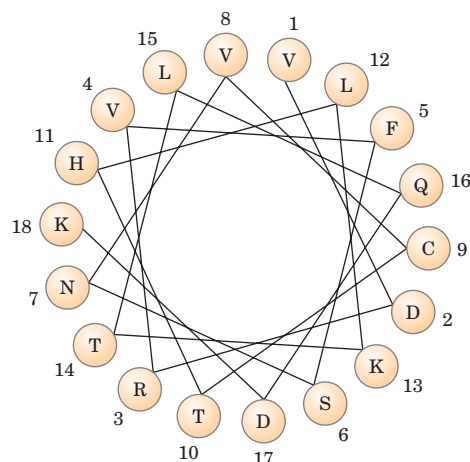
**17.** Tratar uma suspensão de células com NEM não marcado na presença de um excesso de lactose, remover a lactose e adicionar NEM marcado radioativamente. Usar SDS-PAGE para determinar a $M_r$ da banda radioativa (o transportador).

**18.** Construir uma curva de hidropatia; as regiões hidrofóbicas com 20, ou mais, resíduos sugerem segmentos transmembrana. Determinar se a proteína nos eritrócitos intactos interage com um reagente impermeante à membrana, específico para aminas primárias; caso o faça, então o transportador é do tipo I.

**19.** O transportador de leucina é específico para o isômero L, mas o sítio de ligação pode acomodar tanto L-leucina como L-valina. A redução da $V_{máx}$ na ausência de $Na^+$ indica que a leucina (ou a valina) é transportada por simporte com $Na^+$.

**20.** A $V_{máx}$ é reduzida; o $K_t$ não é afetado.

**21.** ~ 1%; estimado pelo cálculo da área de superfície da célula e de 10.000 moléculas de transportador (usando as dimensões da hemoglobina [5,5 nm de diâmetro, p. 163] como modelo de proteína globular).

**22.**

Os aminoácidos com maior índice de hidropatia (V, L, F e C) estão agrupados de um lado da hélice. Essa hélice anfipática provavelmente mergulha na bicamada ao longo de sua superfície hidrofóbica, enquanto expõe a outra superfície à fase aquosa. Alternativamente, um grupo de hélices se reúne com suas superfícies polares em contato umas com as outras e suas superfícies hidrofóbicas voltadas para a bicamada lipídica.

**23.** Cerca de 22. Para estimar a fração de superfície de membrana coberta por fosfolipídeos, será preciso saber (ou estimar) a área transversal média de uma molécula de fosfolipídeo em uma bicamada (p. ex., a partir de um experimento como aquele esquematizado no problema 1 deste capítulo) e a área transversal média de uma proteína de 50 kDa.

**24.** **(a)** O avanço por resíduo de uma hélice $\alpha$ (Capítulo 4) é de 1,5 Å = 0,15 nm. Para atravessar os 4 nm da bicamada, uma hélice $\alpha$ deve conter 27 resíduos; assim, para atravessar sete vezes, são necessários cerca de 190 resíduos. Uma proteína com $M_r$ de 64.000 tem cerca de 580 resíduos. **(b)** Usa-se uma curva de hidropatia para localizar regiões transmembrana. **(c)** Uma vez que cerca da metade dessa porção do receptor de adrenalina consiste em resíduos carregados, representa, provavelmente, uma alça intracelular que conecta duas regiões adjacentes da proteína que atravessam a membrana. **(d)** Uma vez que essa hélice é composta na sua maior parte por resíduos hidrofóbicos, essa região do receptor provavelmente é uma das regiões da proteína que atravessa a membrana.

**25.** **(a)** *Modelo A:* mantido. As duas linhas escuras são ou as camadas de proteína ou os grupos polares dos fosfolipídeos, e o espaço claro é ou a bicamada ou o núcleo hidrofóbico, respectivamente. *Modelo B:* não mantido. Esse modelo requer uma banda corada mais ou menos uniformemente circundando a célula. *Modelo C:* mantido, com restrição. As duas linhas escuras são os grupos polares dos fosfolipídeos; as zonas claras são suas caudas. Assume-se que as proteínas da membrana não são visíveis, porque não se coram com ósmio ou não se encontram nas regiões vistas. **(b)** *Modelo A:* mantido. Uma bicamada "nua" (4,5 nm) + duas camadas de proteínas (2 nm) somam 6,5 nm, que está dentro do limite de espessura observado. *Modelo B:* nem um nem outro. Esse modelo não mantido faz predições sobre a espessura da membrana. *Modelo C:* obscuro. É difícil conciliar o resultado com esse modelo, o qual prediz que a membrana é tão espessa quanto ou ligeiramente mais espessa (em virtude das extremidades das proteínas inseridas, que se projetam) do que a bicamada "nua". O modelo é mantido somente se uma quantidade substancial de proteína se projetar da bicamada. **(c)** *Modelo A:* obscuro. É difícil conciliar o resultado com este modelo. Se as proteínas estão ligadas à membrana por interações iônicas, o modelo prediz que elas contêm alta proporção de aminoácidos carregados, ao contrário do que foi observado. Também, uma vez que a camada proteica deve ser muito fina [ver (b)], não deve ter muito espaço para um núcleo proteico hidrofóbico, de forma que os resíduos hidrofóbicos estariam expos-

tos ao solvente. *Modelo B:* mantido. As proteínas têm uma mistura de resíduos hidrofóbicos (que interagem com os lipídeos) e de resíduos carregados (que interagem com a água). *Modelo C:* mantido. As proteínas têm uma mistura de resíduos hidrofóbicos (ancorados na membrana) e de resíduos carregados (que interagem com a água). **(d)** *Modelo A:* obscuro. É difícil conciliar o resultado com este modelo, que prediz uma proporção exata de 2,0; isso pode ser difícil de alcançar sob condições de pressão fisiologicamente relevantes. *Modelo B:* nem um nem outro. Esse modelo não faz predições sobre a quantidade de lipídeos na membrana. *Modelo C:* mantido. Alguma área de superfície da membrana está ocupada por proteínas, de forma que a proporção deve ser menos de 2,0, conforme foi observado sob condições fisiologicamente mais relevantes. **(e)** *Modelo A:* obscuro. O modelo prediz proteínas em conformação estendida e não globular, portanto mantido somente se for aceito que as proteínas posicionadas na superfície incluam segmentos helicoidais. *Modelo B:* mantido. O modelo prediz principalmente proteínas globulares (contendo alguns segmentos helicoidais). *Modelo C:* mantido. O modelo prediz principalmente proteínas globulares. **(f)** *Modelo A:* obscuro. Os grupos polares fosforilamina estão protegidos pela camada proteica, mas os fosfolipídeos somente estarão completamente protegidos da fosfolipase se as proteínas cobrirem totalmente a superfície. *Modelo B:* mantido. A maioria dos grupos polares está acessível à fosfolipase. *Modelo C:* mantido. Todos os grupos polares estão acessíveis à fosfolipase. **(g)** *Modelo A*: não mantido. As proteínas estão totalmente acessíveis à digestão por tripsina, e praticamente todas sofrerão múltipla hidrólise, sem segmentos hidrofóbicos protegidos. *Modelo B:* não mantido. Praticamente todas as proteínas estão na bicamada e inacessíveis à tripsina. *Modelo C:* mantido. Os segmentos de proteína que penetram ou que atravessam a bicamada estão protegidos da tripsina; aqueles expostos na superfície serão hidrolisados. As porções resistentes à tripsina têm alta proporção de resíduos hidrofóbicos.

## Capítulo 12

**1.** X é cAMP; sua síntese é estimulada pela adrenalina.
**(a)** A centrifugação sedimenta a adenilil-ciclase (a qual catalisa a formação de cAMP) na fração particulada. **(b)** O cAMP adicionado estimula a glicogênio-fosforilase. **(c)** O cAMP é termoestável; ele pode ser preparado pelo tratamento do ATP com hidróxido de bário.

**2.** Ao contrário do cAMP, o dibutiril-cAMP atravessa prontamente a membrana plasmática.

**3.** **(a)** Ela eleva a cAMP. **(b)** O cAMP regula a permeabilidade do $Na^+$. **(c)** A reposição de fluidos corporais e eletrólitos perdidos.

**4.** **(a)** A mutação torna R incapaz de se ligar e inibir C, de modo que C está constantemente ativa. **(b)** A mutação impede que cAMP se ligue à R, deixando C inibida pela ligação à R.

**5.** O albuterol eleva a cAMP, causando o relaxamento e a dilatação dos brônquios e bronquíolos. Como os receptores $\beta$-adrenérgicos controlam muitos outros processos, esse fármaco apresentaria efeitos colaterais indesejáveis. Para minimizá-los, procure um agonista específico para o subtipo dos receptores $\beta$-adrenérgicos encontrados no músculo liso dos brônquios.

**6.** Degradação do hormônio; hidrólise do GTP ligado a uma proteína G; degradação, metabolismo ou sequestro do segundo mensageiro; dessensibilização do receptor; remoção do receptor da superfície celular.

**7.** Fusione CFP à $\beta$-arrestina e YFP ao domínio citoplasmático do receptor $\beta$-adrenérgico ou vice-versa. Em qualquer um dos casos, ilumine em 433 nm e observe tanto em 476 quanto em 527 nm. Se a interação ocorrer, a intensidade da luz emitida diminuirá em 476 nm e aumentará em 527 nm quando a adrenalina for adicionada às células expressando as proteínas fusionadas. Se a interação não ocorrer, o comprimento de onda da luz emitida permanecerá em 476 nm. Algumas razões para possíveis falhas no experimento: as proteínas fusionadas (1) estão inativas ou são por algum motivo incapazes de interagir, (2) não são transportadas às suas localizações normais, ou (3) não são estáveis frente à degradação proteolítica.

**8.** A vasopressina atua por meio da elevação da $[Ca^{2+}]$ citosólica para $10^{-6}$ M, ativando a proteína-cinase C. A injeção de EGTA bloqueia a ação da vasopressina, porém não deve afetar a resposta ao glucagon, que utiliza cAMP, e *não* $Ca^{2+}$, como segundo mensageiro.

**9.** A amplificação é o resultado da ativação de muitas moléculas de um catalisador por uma única molécula de um primeiro catalisador ativado, em uma cascata de amplificação que envolve, na ordem, receptor de insulina, IRS-1, Raf, MEK, ERK; a ERK ativa um fator de transcrição, o qual estimula a síntese de mRNA.

**10.** Uma mutação em *ras* que inativasse a atividade GTPásica da Ras criaria uma proteína que, uma vez ativada pela ligação de GTP, continuaria a emitir, por meio da Raf, o sinal de resposta à insulina.

**11.** *Propriedades compartilhadas entre Ras e* $G_s$: ambas ligam tanto GDP quanto GTP, são ativadas por GTP, ativam uma enzima a jusante quando são ativadas e têm atividade GTPásica intrínseca que as desliga após um curto período de ativação. *Diferenças entre Ras e* $G_s$: Ras é uma proteína G pequena, monomérica; $G_s$ é heterotrimérica. *Diferenças funcionais entre* $G_s$ *e* $G_i$: $G_s$ ativa a adenilil-ciclase, $G_i$, inibe-a.

**12.** *Cinase* (*fator entre parênteses*): PKA (cAMP), PKG (cGMP), PKC ($Ca^{2+}$, DAG), $Ca^{2+}$/CaM-cinase ($Ca^{2+}$, CaM), cinase dependente de ciclina (ciclina), proteína Tyr-cinase (o ligante do receptor, como a insulina), MAPK (Raf) e glicogênio-fosforilase-cinase (PKA).

**13.** $G_s$ permanece na forma ativada quando o análogo não hidrolisável está ligado. O análogo, portanto, prolonga o efeito da adrenalina na célula injetada.

**14.** **(a)** Utilize a resina cromatográfica ligada à $\alpha$-bungarotoxina para purificação por afinidade (ver Figura 3-17c) do AChR. Extraia as proteínas dos órgãos elétricos e passe a mistura pela coluna cromatográfica. O AChR liga-se seletivamente à resina. Elua o AChR com um soluto que enfraqueça sua interação com a $\alpha$-bungarotoxina. **(b)** Utilize a ligação de $[^{125}I]\alpha$-bungarotoxina como *ensaio quantitativo* para o AChR durante a purificação por diversas técnicas. A cada etapa, teste o AChR pela dosagem da ligação de $[^{125}I]\alpha$-bungarotoxina às proteínas da amostra. Aperfeiçoe a purificação para a maior atividade específica de AChR (contagens/min de $[^{125}I]\alpha$-bungarotoxina por mg de proteína) no material final.

**15.** **(a)** Não. Se a $V_m$ fosse determinada pela permeabilidade (principalmente) ao $K^+$, a equação de Nernst prediria uma $V_m$ de $-90$ mV, não de $-95$ mV como observado, de maneira que alguma outra condutância contribuiria para $V_m$. **(b)** O íon cloreto é provavelmente o determinante de $V_m$; o $E_{Cl^-}$ predito é $-94$ mV.

**16.** **(a)** A $V_m$ da membrana do oócito varia de $-60$ mV para $-10$ mV, isto é, a membrana é despolarizada. **(b)** O efeito do KCl depende do influxo de $Ca^{2+}$ a partir do meio extracelular.

**17.** A hiperpolarização resulta no fechamento dos canais de $Ca^{2+}$ dependentes de voltagem na região pré-sináptica do bastonete. O resultante decréscimo na $[Ca^{2+}]_{in}$ diminui a liberação de um neurotransmissor inibitório que suprime a atividade do próximo neurônio do circuito visual. Quando essa inibição é removida em resposta a um estímulo luminoso, o circuito torna-se ativo e os centros visuais do cérebro são excitados.

**18.** **(a)** A mutação impediria o influxo de $Na^+$ e $Ca^{2+}$ para dentro das células em resposta à luz; os cones falhariam em sinalizar ao cérebro a detecção da luz. Como os bastonetes não são afetados, os indivíduos seriam capazes de enxergar, mas não teriam a visão em cores. **(b)** A mutação impediria o efluxo de $K^+$, o que levaria à despolarização da membrana das células $\beta$ e à liberação constitutiva de insulina no sangue. **(c)** O ATP é responsável pelo fechamento desse canal, de maneira que os canais permaneceriam abertos, impedindo a despolarização da membrana das células $\beta$ e a liberação de insulina.

**19.** Pessoas com a doença de Oguchi poderiam apresentar defeitos na rodopsina-cinase ou na arrestina.

**20.** Os bastonetes não mais mostrariam qualquer variação no potencial de membrana em resposta à luz. Este experimento foi realizado. A iluminação de fato ativou a PDE, porém a enzima não conseguiu reduzir significativamente o nível de 8-Br-cGMP, que permaneceu muito acima do necessário para manter os canais iônicos abertos. Portanto, a luz não tem efeito sobre o potencial de membrana.

**21.** **(a)** Com a exposição ao calor, os canais TRPV1 se abrem, causando um influxo de $Na^+$ e $Ca^{2+}$ para dentro do neurônio sensorial. Isso despolariza o neurônio, iniciando um potencial de ação. Quando o potencial de ação atinge os terminais do axônio, o neurotransmissor é liberado, sinalizando ao sistema nervoso a sensação de calor. **(b)** A capsaicina mimetiza os efeitos do calor por meio da abertura de TRPV1 em baixas temperaturas, levando a uma falsa sensação de calor. O $EC_{50}$ extremamente baixo indica que mesmo quantidades muito pequenas de capsaicina terão efeitos sensoriais drásticos. **(c)** Em baixos níveis, o mentol abrirá o canal TRPM8, levando à sensação de frescor; em altos níveis, ambos TRPM8 e TRPV3 abrirão, levando à sensação mista de frescor e calor, como você deve experimentar com mentas muito fortes.

**22.** **(a)** Essas mutações poderiam levar à ativação permanente do receptor para $PGE_2$, levando à divisão celular desregulada e ao desenvolvimento de tumor. **(b)** O gene viral pode codificar uma forma constitutivamente ativa do receptor, causando a constante sinalização para a divisão celular e, portanto, o desenvolvimento de tumor. **(c)** A proteína E1A pode ligar-se a pRb e impedir a ligação de E2F, de modo que E2F está constantemente ativa e as células dividem-se incontrolavelmente. **(d)** As células pulmonares não respondem normalmente à $PGE_2$, pois não expressam o receptor para $PGE_2$. Mutações que resultem no receptor de $PGE_2$ constitutivamente ativo não afetam as células pulmonares.

**23.** Um gene supressor tumoral codifica uma proteína que restringe a divisão celular. Uma forma mutante da proteína falha na supressão da divisão celular, mas se um dos alelos codifica uma proteína normal, a função continuará normal. Um oncogene normal codifica uma proteína reguladora que promove a divisão celular, mas apenas quando um sinalizador apropriado (fator de crescimento) estiver presente. A versão mutante do produto do oncogene constantemente envia sinais para a divisão, caso o fator de crescimento esteja presente ou não.

**24.** Em uma criança que desenvolve múltiplos tumores em ambos os olhos, cada célula da retina tem uma cópia defeituosa do gene *Rb* no momento do nascimento. Cedo na vida da criança, diversas células independentes sofreram uma segunda mutação, que danificou o alelo *Rb* correto, produzindo um tumor. Uma criança que desenvolve um único tumor tem, no momento do nascimento, duas cópias corretas do gene *Rb* em cada célula; a mutação de ambos os alelos *Rb* de uma mesma célula (extremamente rara) causou um único tumor.

**25.** Duas células que expressam o mesmo receptor de superfície podem apresentar diferentes conjuntos de proteínas-alvo para a fosforilação proteica.

**26.** **(a)** O modelo com base nas células prediz que diferentes receptores estão presentes em diferentes células. **(b)** Esse experimento analisa a independência das diferentes sensações do paladar. Mesmo que os receptores para doce e/ou umami estejam ausentes, as outras sensações do paladar dos animais estão normais; portanto, a sensação de sabores agradáveis e desagradáveis é independente. **(c)** Sim. A perda tanto das subunidades T1R1 quanto das T1R3 anula a sensação do sabor umami. **(d)** Ambos os modelos. Em qualquer um dos modelos, a remoção de um receptor eliminaria a sensação daquele sabor determinado. **(e)** Sim. A perda tanto das subunidades T1R2 quanto T1R3 anula, quase completamente, a sensação do sabor doce; a completa eliminação do sabor doce requer a deleção das duas subunidades. **(f)** Em concentrações de sacarose muito altas, receptores T1R2 e, em menor extensão, T1R3, na forma de homodímeros, podem detectar o sabor doce. **(g)** Os resultados são consistentes com qualquer um dos modelos, que fortalecem as conclusões dos pesquisadores. A interação com o ligante pode ser completamente separada da sensação do paladar. Se o ligante para o receptor presente nas "células do sabor doce" ligar uma molécula, os camundongos selecionarão aquela molécula como composto doce.

## Capítulo 13

**1.** Considerar o embrião de pinto como o sistema; os nutrientes, a casca do ovo e o mundo exterior são o meio ambiente. A transformação de uma única célula em um pinto reduz drasticamente a entropia do sistema. Inicialmente, as partes do ovo do lado de fora do embrião (o ambiente) contêm moléculas complexas de combustível (condição de baixa entropia). Durante a incubação, algumas dessas moléculas complexas são convertidas em uma grande quantidade de moléculas de $CO_2$ e $H_2O$ (alta entropia). Esse aumento da entropia do ambiente é maior do que a redução da entropia do pinto (o sistema).

**2.** **(a)** − 4,8 kJ/mol **(b)** 7,56 kJ/mol **(c)** −13,7 kJ/mol.

**3.** **(a)** 262 **(b)** 608 **(c)** 0,30.

**4.** $K'_{eq} = 21$; $\Delta G'° = -7{,}6$ kJ/mol.

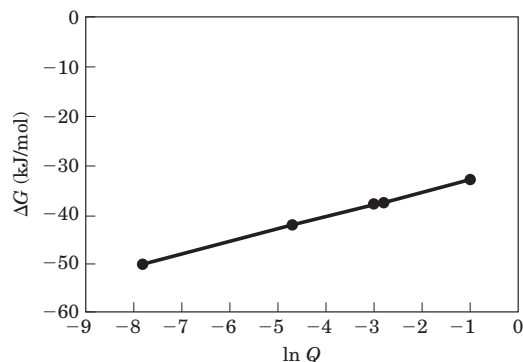
**5.** − 31 kJ/mol.

**6.** **(a)** −1,68 kJ/mol **(b)** −4,4 kJ/mol **(c)** Em certa temperatura, o valor de $\Delta G'°$ para qualquer reação é fixado e definido para condições-padrão (aqui, frutose-6-fosfato e glicose-6-fosfato a 1 M). Em contrapartida, $\Delta G$ é uma variável que pode ser calculada para qualquer conjunto de concentrações de reagente e produto.

**7.** $K'_{eq} \approx 1$; $\Delta G'° \approx 0$.

**8.** Menos. A equação total da hidrólise de ATP pode ser semelhante a $ATP^{4-} + H_2O \rightarrow ADP^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+$ (isso é somente uma aproximação, porque as espécies ionizadas mostradas aqui são as principais, mas não as únicas formas presentes). Sob condições padrão (isto é, [ATP] = [ADP] = [$P_i$] = 1 M), a concentração da água é 55 M e não se altera durante a reação. Uma vez que são produzidos íons $H^+$ na reação, em uma [$H^+$] mais alta (pH 5,0), o equilíbrio se desloca para a esquerda, e menos energia livre é liberada.

**9.** 10.

**10.**

A $\Delta G$ da hidrólise do ATP é mais baixa quando [ATP]/[ADP] for baixa (<< 1) do que quando [ATP]/[ADP] for alta. A energia disponível para a célula a partir de uma dada [ATP] é mais baixa quando a relação [ATP]/[ADP] cai e alta quando a relação aumenta.

**11.** **(a)** $3{,}85 \times 10^{-3}$ M$^{-1}$; [glicose-6-fosfato] = $8{,}9 \times 10^{-8}$ M; não. **(b)** 14 M; essa não é uma etapa aceitável, porque a solubilidade máxima da glicose é menos de 1 M. **(c)** 837 ($\Delta G'° = -16{,}7$ kJ/mol; [glicose] = $1{,}2 \times 10^{-7}$ M; sim. **(d)** Não. Isso requereria uma concentração de $P_i$ tão alta que os sais de fosfato de cátions divalentes precipitariam. **(e)** Pela transferência direta do grupo fosforil do ATP para a glicose, o potencial de transferência do grupo fosforil ("tendência" ou "pressão") do ATP é utilizado sem gerar altas concentrações de intermediários. A parte essencial dessa transferência é, naturalmente, a catálise enzimática.

**12.** **(a)** − 12,5 kJ/mol **(b)** − 14,6 kJ/mol.

**13.** **(a)** $3 \times 10^{-4}$ **(b)** 68,7 **(c)** $7{,}4 \times 10^4$.

**14.** − 13 kJ/mol.

**15.** 46,7 kJ/mol.

**16.** A isomerização desloca o grupo carbonil do C-1 para o C-2, estabelecendo a quebra da ligação carbono-carbono entre C-3 e C-4. Sem a isomerização, a quebra da ligação ocorreria entre C-2 e C-3, com a geração de um composto de dois carbonos e um de quatro.

**17.** O mecanismo é o mesmo daquele da reação da álcool-desidrogenase (ver Figura 14-14).

**18.** O primeiro passo é o inverso de uma condensação aldólica (ver mecanismo da aldolase, Figura 14-6); o segundo passo é uma condensação aldólica (ver Figura 13-4).

**19.** **(a)** 46 kJ/mol **(b)** 46 kg; 68% **(c)** O ATP é sintetizado quando necessário, sendo então quebrado em ADP e $P_i$; sua concentração é mantida em um estado estacionário.

**20.** O sistema do ATP está em estado estacionário dinâmico; a [ATP] permanece constante porque a taxa de seu consumo é igual à taxa de sua síntese. O consumo de ATP envolve a liberação do grupo fosforila terminal ($\gamma$); a síntese de ATP a partir de ADP envolve reposição desse grupo fosforila. Por isso, o fosfato terminal passa por uma reposição rápida. Em contrapartida, a reposição do fosfato central ($\beta$) é relativamente lenta.

**21.** **(a)** 1,7 kJ/mol **(b)** A pirofosfatase inorgânica catalisa a hidrólise do pirofosfato e conduz a reação no sentido da síntese de acetil-CoA.

**22.** 36 kJ/mol.

**23.** **(a)** $NAD^+$/NADH **(b)** Piruvato/lactato **(c)** Formação de lactato **(d)** − 26,1 kJ/mol **(e)** $3{,}63 \times 10^4$.

**24.** **(a)** 1,14 V **(b)** − 220 kJ/mol **(c)** ~ 4.

**25.** **(a)** − 0,35 V **(b)** − 0,320 V **(c)** − 0,29 V.

**26.** Em ordem de aumento de tendência: (a), (d), (b), (c).

**27.** (c) e (d).

**28.** **(a)** O estado de mais baixa energia e de mais alta entropia ocorre quando a concentração do corante é a mesma nas duas células. Se uma junção tipo fenda do tipo "armadilha de peixe" permitir o transporte unidirecional, uma maior quantidade de corante irá para o oligodendrócito e menos para o astrócito. Esse é um estado de mais alta energia e de mais baixa entropia do que o estado de partida, violando a segunda lei da termodinâmica. O modelo proposto por Robinson e colaboradores requer uma redução espontânea impossível da entropia. Em termos de energia, o modelo vincula uma variação espontânea do estado de mais baixa energia para um de mais alta energia sem aporte de energia – de novo, termodinamicamente impossível. **(b)** As moléculas, ao contrário dos peixes, não exibem *comportamento direcionado*; elas se movem ao acaso por movimento browniano. A difusão resulta em um movimento *efetivo* de moléculas de uma região de concentração mais alta para uma região de concentração mais baixa simplesmente porque é mais provável que uma molécula que esteja no lado mais concentrado entre no canal de conexão. Veja isso como uma via com etapa limitante de velocidade: a extremidade estreita do canal. A extremidade mais estreita limita a velocidade com a qual as moléculas atravessam porque o movimento aleatório é menos adequado para movê-las através do diâmetro menor. A extremidade ampla do canal *não* atua como um funil para as moléculas, embora o faça para os peixes, porque as moléculas não são "comprimidas" pelos lados do funil estreito como os peixes o são. A extremidade estreita limita a velocidade do movimento igualmente em ambos os sentidos. Quando as concentrações em ambos os lados se igualarem, a velocidade em ambos os sentidos também será igual, e não haverá variação na concentração. **(c)** Os peixes exibem *comportamento não aleatório*, ajustando suas ações em resposta ao meio ambiente. Os peixes que entram na abertura larga do canal tendem a se mover para adiante, porque seu comportamento induz o movimento adiante, e eles se "aglomeram" à medida que se movem pelo canal estreito. É fácil para os peixes entrar na abertura larga, mas eles não saem da armadilha tão facilmente porque é menos provável que entrem na abertura estreita. **(d)** Existem muitas explicações possíveis, algumas das quais foram propostas pelos autores das cartas que criticaram o artigo. Aqui estão duas. (1) *O corante se liga a uma molécula no oligodendrócito.* A ligação remove efetivamente o corante do solvente, de forma que ele não "conta" como soluto para as considerações termodinâmicas, embora permaneça visível ao microscópio de fluorescência. (2) *O corante é sequestrado em uma organela subcelular do oligodendrócito,* sendo bombeado ativamente à custa deATP ou atraído por outras moléculas dessa organela.

## Capítulo 14

**1.** Equação resultante: Glicose + 2ATP → 2 gliceraldeído-3-fosfato + 2ADP + $2H^+$; $\Delta G'^\circ = 2{,}1$ kJ/mol.

**2.** Equação resultante: 2 gliceraldeído-3-fosfato + 4ADP + $2P_i$ → 2 lactato + $2NAD^+$; $\Delta G'^\circ = -114$ kJ/mol.

**3.** GLUT2 (e GLUT1) é encontrado no fígado e está sempre presente na membrana plasmática dos hepatócitos. GLUT3 está sempre presente na membrana plasmática de determinada células do cérebro. GLUT4 é normalmente sequestrado em vesículas nas células musculares e do tecido adiposo e se introduz na membrana plasmática somente em resposta à insulina. Assim, o fígado e o cérebro podem captar glicose do sangue independentemente do nível de insulina, mas o músculo e o tecido adiposo a captam somente quando os níveis de insulina se elevam em resposta à glicose sanguínea alta.

**4.** $CH_3CHO + NADH + H^+ \rightleftharpoons CH_3CH_2OH + NAD^+$; $K'_{eq} = 1{,}45 \times 10^4$.

**5.** − 8,6 kJ/mol.

**6.** **(a)** $^{14}CH_3CH_2OH$ **(b)** [3-$^{14}$C]glicose ou [4-$^{14}$C]glicose.

**7.** A fermentação libera energia, e uma parte é conservada na forma de ATP, mas uma grande quantidade é dissipada como calor. Se o conteúdo do fermentador não for resfriado, a temperatura se torna alta o suficiente para matar os microrganismos.

**8.** Grãos de soja e trigo contêm amido, um polímero de glicose. Os microrganismos degradam o amido em glicose, glicose em piruvato via glicólise, e piruvato em lactato – porque o processo se realiza na ausência de $O_2$ (ou seja, é uma fermentação). Se o $O_2$ estiver presente, o piruvato será oxidado a acetil-CoA e então a $CO_2$ e $H_2O$. Certa quantidade de acetil-CoA, contudo, será também hidrolisada a ácido acético (vinagre) na presença de oxigênio.

**9.** C-1. Esse experimento demonstra a reversibilidade da reação da aldolase. O C-1 do gliceraldeído-3-fosfato é equivalente ao C-4 da frutose-1-6-difosfato (ver Figura 14-7). O gliceraldeído-3-fosfato inicial deve ser marcado no C-1. O C-3 da di-hidroxiacetona-fosfato se torna marcado pela reação da triose-fosfato-isomerase, gerando a frutose-1--6-bifosfato marcada no C-3.

**10.** Não. Não há produção de ATP em condições anaeróbias; a produção aeróbia de ATP será levemente reduzida.

**11.** Não. A lactato-desidrogenase é requerida para a reposição de $NAD^+$ a partir do NADH formado durante a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato.

**12.** A transformação de glicose em lactato ocorre quando os miócitos estão com baixo oxigênio, e isso proporciona um meio de gerar ATP sob condições de deficiência de $O_2$. A glicose não é gasta porque o lactato pode ser oxidado a piruvato; esse é oxidado em reações aeróbias quando o $O_2$ se torna abundante. Essa flexibilidade metabólica dá ao organismo uma maior capacidade de adaptação ao seu ambiente.

**13.** Ela remove rapidamente o 1,3-bifosfoglicerato em uma etapa subsequente favorável, catalisada pela fosfoglicerato-cinase.

**14.** **(a)** O produto é 3-fosfoglicerato **(b)** Não há síntese resultante de ATP em condições anaeróbias na presença de arsenato.

**15.** **(a)** A fermentação do etanol requer 2 mols de $P_i$ por mol de glicose. **(b)** O etanol é o produto reduzido formado durante a reoxidação do NADH a $NAD^+$, e o $CO_2$ é o subproduto da conversão do piruvato a etanol. Sim; o piruvato deve ser convertido em etanol para a produção de um suprimento contínuo de $NAD^+$ para a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato. A frutose-1,6-bifosfato se acumula; ela se forma como um intermediário na glicólise. **(c)** O arsenato substitui o $P_i$ na reação da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase e forma um acil-arsenato, que é hidrolisado espontaneamente. Isso impede a formação de ATP, mas o 3-fosfoglicerato continua na via.

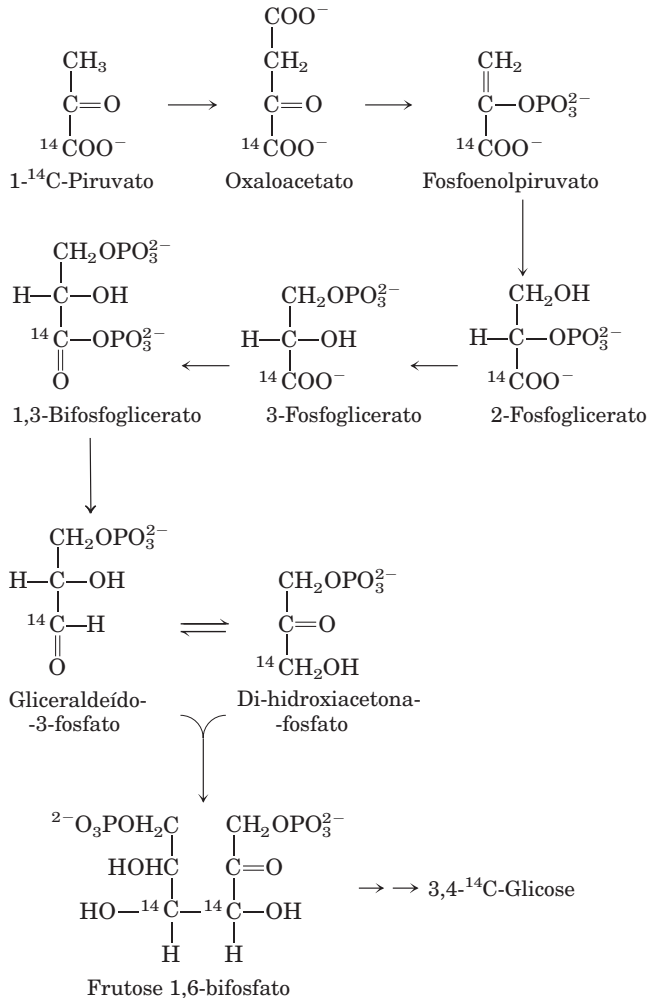
**16.** A niacina da dieta é usada para sintetizar $NAD^+$. As oxidações efetuadas pelo $NAD^+$ são parte de processos cíclicos, tendo o $NAD^+$ como carreador de elétrons (agente redutor); uma molécula de $NAD^+$ oxida muitos milhares de moléculas de glicose, e assim a necessidade da vitamina precursora (niacina) na dieta é relativamente pequena.

**17.** Di-hidroxiacetona-fosfato + NADH + $H^+$ → glicerol-3-fosfato + $NAD^+$ (catalisada por uma desidrogenase)

**18.** *Deficiência de galactocinase:* galactose (menos tóxica); *UDP-glicose: deficiência de uridilil-galactose-1-fosfato:* galactose-1-fosfato (mais tóxica).

**19.** As proteínas são degradadas a aminoácidos utilizados na gliconeogênese.

**20.** **(a)** Na reação da piruvato-carboxilase, $^{14}CO_2$ é adicionado ao piruvato, mas a PEP-carboxicinase remove o *mesmo* $CO_2$ na etapa seguinte. Assim, o $^{14}C$ não é incorporado (inicialmente) na glicose.

1-$^{14}$C-Piruvato → Oxaloacetato → Fosfoenolpiruvato → 2-Fosfoglicerato → 3-Fosfoglicerato → 1,3-Bifosfoglicerato → Gliceraldeído-3-fosfato ⇌ Di-hidroxiacetona-fosfato → Frutose 1,6-bifosfato → → 3,4-$^{14}$C-Glicose

**21.** Quatro equivalentes de ATP por molécula de glicose.

**22.** A gliconeogênese seria altamente endergônica, e seria impossível regular a gliconeogênese e a glicólise separadamente.

**23.** A célula "gasta" 1 ATP e 1 GTP para converter piruvato em PEP.

**24.** (a), (b), (d) são glicogênicos; (c) e (e) não são.

**25.** O consumo de álcool força a competição por $NAD^+$ entre o metabolismo do etanol e a gliconeogênese. O problema é uma combinação de exercício extenuante e falta de alimento, porque a esta altura o nível de glicose no sangue já é baixo.

**26.** **(a)** O aumento rápido da glicólise; o aumento do piruvato e do NADH resulta em aumento do lactato. **(b)** O lactato é transformado em glicose via piruvato; esse é o processo mais lento, já que a formação do piruvato é limitada pela disponibilidade de $NAD^+$, o equilíbrio da LDH é favorável ao lactato, e a conversão do piruvato em glicose necessita de energia. **(c)** O equilíbrio da reação da LDH é favorável à formação de lactato.

**27.** O lactato é transformado em glicose no fígado pela gliconeogênese (ver Figuras 14-16, 14-17). Um defeito na FBPase-1 impediria a entrada do lactato na via gliconeogênica nos hepatócitos, causando acúmulo de lactato no sangue.

**28.** O succinato é transformado em oxaloacetato, o qual passa para o citosol e é convertido em PEP pela PEP-carboxicinase. Dois mols de PEP são requeridos para a produção de um mol de glicose pela rota delineada na Figura 14-17.

**29.** Se as vias catabólica e anabólica do metabolismo da glicose estiverem operando simultaneamente, ocorre ciclo fútil de ATP, com consumo extra de $O_2$.

**30.** No mínimo, o acúmulo de ribose-5-fosfato tenderia a forçar essa reação no sentido inverso pela ação das massas (ver Equação 13-4). Poderia também afetar outras reações metabólicas que envolvem a ribose-5-fosfato como substrato ou produto – como as vias de síntese de nucleotídeos.

**31.** **(a)** É provável que a tolerância ao etanol envolva muito mais genes, e nesse caso a engenharia genética significaria um projeto muito mais complicado **(b)** A L-arabinose-isomerase (a enzima *araA)* converte aldose em cetose ao mover o grupo carbonil de um açúcar não fosforilado do C-1 para o C-2. Não é discutida nenhuma enzima análoga neste capítulo; todas as enzimas descritas aqui atuam sobre açúcares fosforilados. Uma enzima que executa uma transformação similar com açúcares fosforilados é a fosfoexose-isomerase. A L-ribulocinase (*araB*) fosforila um açúcar no C-5 pela transferência do fosfato $\gamma$ do ATP. Muitas dessas reações estão descritas neste capítulo, incluindo a reação da hexocinase. A L-ribulose-5-fosfato-epimerase (*araD*) troca os grupos —H e —OH no carbono quiral de um açúcar. Neste capítulo não está descrita nenhuma reação similar, mas está no Capítulo 20 (ver Figura 20-13). **(c)** As três enzimas *ara* convertem arabinose em xilulose-5-fosfato pela seguinte via: Arabinose $\xrightarrow{\text{L-arabinose-isomerase}}$ L-ribulose $\xrightarrow{\text{L-ribulocinase}}$ L-ribulose-5-fosfato $\xrightarrow{\text{epimerase}}$ xilulose-5-fosfato **(d)** A arabinose é convertida em xilulose-5-fosfato como em (c), a qual entra na via mostrada na Figura 14-23; o produto glicose-6-fosfato é então fermentado a etanol e $CO_2$. **(e)** 6 moléculas de arabinose + 6 moléculas de ATP são convertidas em 6 moléculas de xilulose-5-fosfato, que alimentam a via mostrada na Figura 14-23 para gerar 5 moléculas de glicose-6-fosfato, e cada uma delas é fermentada para gerar 3 ATP (elas entram como glicose-6-fosfato não como glicose) − 15 ATP no total. De ponta a ponta, espera-se a geração de 15 ATP − 6 ATP = 9 ATP a partir de 6 moléculas de arabinose. Os outros produtos são 10 moléculas de etanol e 10 moléculas de $CO_2$. **(f)** Dada a geração de ATP mais baixa, para um crescimento (isto é, disponibilidade de ATP) equivalente àquele obtido sem os genes adicionados, o *Z. mobilis* modificado deve fermentar mais arabinose, e dessa forma ele produz mais etanol. **(g)** Uma maneira de permitir o uso de xilose seria a adição de genes para duas enzimas: uma análoga da enzima *araD* que converte xilose em ribose pela troca de —H e —OH no C-3, e uma análoga da enzima *araB* que fosforila a ribose no C-5. A ribose-5-fosfato resultante supriria a via existente.

## Capítulo 15

**1.** **(a)** 0,0293 **(b)** 308 **(c)** Não. $Q$ é muito mais baixo do que $K'_{eq}$, indicando que a reação da PFK-1 está longe do equilíbrio nas células; essa reação é mais lenta do que a reação posterior na glicólise. O fluxo pela via glicolítica é basicamente determinado pela atividade da PFK-1.

**2.** **(a)** $1,4 \times 10^{-9}$ M **(b)** A concentração fisiológica (0,023 mM) é 16.000 vezes a concentração no equilíbrio; essa reação não alcança o equilíbrio na célula. Muitas reações não estão em equilíbrio na célula.

**3.** Na ausência de $O_2$, o ATP necessário é produzido pelo metabolismo anaeróbio da glicose (fermentação a lactato). Uma vez que a oxidação aeróbia da glicose produz muito mais ATP do que a fermentação, é necessário menos glicose para produzir a mesma quantidade de ATP.

**4.** **(a)** Existem dois sítios de ligação para o ATP: um sítio catalítico e um sítio de regulação. A ligação do ATP ao sítio de regulação inibe a PFK-1, pela redução da $V_{máx}$ ou pelo aumento do $K_m$ para o ATP no sítio catalítico. **(b)** O fluxo glicolítico é reduzido quando há abundância de ATP. **(c)** O gráfico indica que o aumento da [ADP] suprime a inibição pelo ATP. Uma vez que a quantidade de nucleotídeos de adenina é razoavelmente constante, o consumo de ATP leva a um aumento na [ADP]. Os dados mostram que a atividade da PFK-1 pode ser regulada pela proporção [ATP]/[ADP].

**5.** O grupo fosfato da glicose-6-fosfato está completamente ionizado em pH 7, dando à molécula uma carga total negativa. Uma vez que as membranas são geralmente impermeáveis a moléculas eletricamente carregadas, a glicose-6-fosfato não consegue passar da corrente sanguínea para as células e, por isso, não entra na via glicolítica e gera ATP. (Esse é o motivo pelo qual a glicose, uma vez fosforilada, não consegue escapar da célula.)

**6.** **(a)** *No músculo:* a degradação do glicogênio fornece energia (ATP) via glicólise. A glicogênio-fosforilase catalisa a conversão do glicogênio armazenado em glicose-1-fosfato, que é convertida em glicose-6-fosfato, intermediário da glicólise. Durante atividade intensa, o músculo esquelético requer grande quantidade de glicose-6-fosfato. *No fígado:* a degradação do glicogênio mantém um nível sanguíneo constante de glicose entre as refeições (a glicose-6-fosfato é convertida em glicose livre). **(b)** No trabalho muscular ativo, a necessidade de fluxo de ATP é muito alta, e a glicose-1-fosfato deve ser produzida rapidamente, o que requer alta $V_{máx}$.

**7.** **(a)** $[P_i]$/[glicose-1-fosfato] = 3,3/1 **(b)**, **(c)** O valor dessa proporção na célula (> 100:1) indica que a [glicose-1-fosfato] está bem abaixo do nível de equilíbrio. A glicose-1-fosfato é removida (para entrar na glicólise) com velocidade muito maior do que sua velocidade de produção (pela reação da glicogênio-fosforilase), de modo que o fluxo metabólico é do glicogênio para a glicose-1-fosfato. A reação da glicogênio-fosforilase é, provavelmente, a etapa reguladora na degradação do glicogênio.

**8.** **(a)** aumenta. **(b)** diminui. **(c)** aumenta.

**9.** *Repouso:* alta [ATP]; baixa [AMP]; [acetil-CoA] e [citrato] intermediária. *Corrida:* [ATP] intermediária; alta [AMP]; baixa [acetil-CoA] e [citrato]. O fluxo de glicose pela glicólise aumenta durante a corrida anaeróbia porque (1) a inibição do ATP pela glicogênio-fosforilase e pela PFK-1 é parcialmente abrandada, (2) O AMP estimula ambas as enzimas, e (3) os níveis baixos de citrato e de acetil-CoA abrandam seus efeitos inibidores respectivamente sobre a PFK-1 e sobre a piruvato-cinase.

**10.** O pássaro migratório conta com uma oxidação de gorduras altamente eficiente, em vez do metabolismo anaeróbio da glicose utilizado pelo coelho corredor. O pássaro reserva o glicogênio de seus músculos para curtas “explosões” de energia durante situações de emergência.

**11.** *Caso A:*(f) (3); *Caso B:* (c) (3); *Caso C:* (h) (4); *Caso D:* (d) (6).

**12.** **(a)** (1) Tecido adiposo: síntese mais lenta de ácidos graxos; (2) Músculo: glicólise, síntese mais lenta de ácidos graxos e de glicogênio; (3) Fígado: glicólise mais rápida; gliconeogênese, síntese mais lenta de ácidos graxos e de glicogênio; via das pentoses-fosfato inalterada. **(b)** (1) Tecido adiposo e (3) fígado: síntese de ácidos graxos mais lenta porque a falta de insulina resulta na inativação da acetil--CoA-carboxilase, a primeira enzima da via. A síntese de glicogênio é inibida pela fosforilação dependente de AMP cíclico (e consequente ativação) da glicogênio-sintase. (2) Músculo: a glicólise está mais lenta porque o GLUT4 está inativo, inibindo a captação da glicose. (3) Fígado: a glicólise está mais lenta porque o complexo bifuncional PFK-1/FBPase-2 está em sua forma com a FBPase-2 ativa, reduzindo a [frutose-2,6-bifosfato], o que estimula alostericamente a fosfofrutocinase e inibe a FBPase-1; isso também é responsável pela estimulação da gliconeogênese.

**13.** **(a)** elevados. **(b)** elevados. **(c)** elevados.

**14.** **(a)** A PKA não pode ser ativada em resposta ao glucagon ou à adrenalina, e a glicogênio-fosforilase não é ativada. **(b)** PP1 permanece ativo permitindo a desfosforilação da glicogênio-sintase (ativando-a) e da glicogênio-fosforilase (inibindo-a). **(c)** A fosforilase permanece fosforilada (ativa), aumentando a degradação do glicogênio. **(d)** A gliconeogênese não pode ser estimulada quando os níveis de glicose sanguínea forem baixos, levando a um nível glicêmico perigosamente baixo durante períodos de jejum.

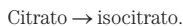
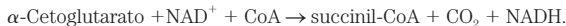
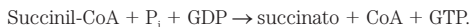
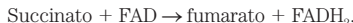
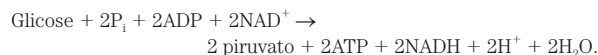
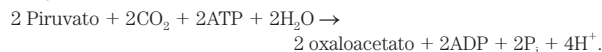
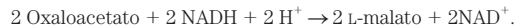
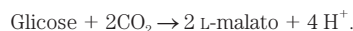
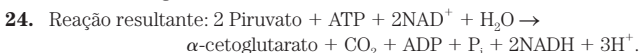
**15.** A queda na glicose sanguínea desencadeia a liberação de glucagon pelo pâncreas. No fígado, o hormônio ativa a glicogênio-fosforilase pela estimulação de sua fosforilação dependente de AMP cíclico e estimula a gliconeogênese pela redução da [frutose-2,6-bifosfato], estimulando, desse modo, a FBPase-1.

**16.** **(a)** Capacidade de mobilização do glicogênio reduzida; glicose sanguínea mais baixa entre as refeições. **(b)** Capacidade reduzida de baixar os níveis de glicose sanguínea após uma refeição rica em carboidratos; glicose sanguínea elevada. **(c)** Frutose-2,6-bifosfato (F26BP) reduzida no fígado, o que estimula a glicólise e inibe a gliconeogênese. **(d)** F26BP reduzida, o que inibe a glicólise e estimula a gliconeogênese **(e)** Captação de ácidos graxos e de glicose aumentada; aumento da oxidação de ambos. **(f)** Conversão do piruvato em acetil-CoA aumentada; síntese de ácidos graxos aumentada.

**17.** **(a)** Dado que cada partícula contém cerca de 55.000 resíduos de glicose, a concentração equivalente de glicose livre seria 55.000 × 0,01 $\mu$M = 550 mM ou 0,55 M. Isso representaria um desafio osmótico sério para a célula! (Os fluidos corporais têm uma osmolaridade substancialmente mais baixa.). **(b)** Quanto menor o número de ramificações, menor o número de extremidades livres disponíveis para a ação da glicogênio-fosforilase, e menor a taxa de liberação de glicose. Sem ramificações, haveria somente um sítio para a atuação da enzima. **(c)** A camada externa da partícula estaria muito cheia de resíduos de glicose para que a enzima tivesse acesso às ligações para hidrolisá-las e liberar glicose. **(d)** O número de cadeias duplas em cada camada sucessiva: a camada 1 tem uma cadeia ($2^0$), a camada 2 tem duas ($2^1$), a camada 3 tem quatro ($2^2$), e assim por diante. Assim, para $t$ camadas, o número de cadeias na camada mais externa, $C_A$, é $2^{t-1}$. **(e)** O número total de cadeias é $2^0 + 2^1 + 2^2 + ... 2^{t-1} = 2^t - 1$. Cada cadeia contém $g_c$ moléculas de glicose, de modo que o número total de moléculas de glicose, $G_T$, é $g_c(2t - 1)$. **(f)** A glicogênio-fosforilase pode liberar todos os resíduos de glicose de uma cadeia de comprimento $g_c$, menos quatro. Por isso, para cada cadeia na camada externa, a enzima pode liberar $(g_c - 4)$ moléculas de glicose. Dado que existem $2^{t-1}$ cadeias na camada externa, o número de moléculas de glicose que a enzima pode liberar, $G_{PT}$, é $(g_c - 4)(2^{t-1})$. **(g)** O Volume de uma esfera é $\frac{4}{3}\pi r^3$. Nesse caso, $r$ é a espessura de uma camada vezes o número de camadas, ou $(0{,}12\, g_c + 0{,}35)t$ nm. Assim, $V_s = \frac{4}{3}\pi t^3(0{,}12\, g_c + 0{,}35)^3$ nm$^3$. **(h)** Você pode mostrar algebricamente que o valor de $g_c$ que maximiza $f$ é independente de $t$. Escolhendo $t = 3$:

| $g_c$ | $C_A$ | $G_T$ | $G_{PT}$ | $V_s$ | $f$ |
|---|---|---|---|---|---|
| 5 | 4 | 35 | 4 | 11 | 5,8 |
| 6 | 4 | 42 | 8 | 19 | 9,7 |
| 7 | 4 | 49 | 12 | 24 | 12 |
| 8 | 4 | 56 | 16 | 28 | 14 |
| 9 | 4 | 63 | 20 | 32 | 15 |
| 10 | 4 | 70 | 24 | 34 | 16 |
| 11 | 4 | 77 | 28 | 36 | 16 |
| 12 | 4 | 84 | 32 | 38 | 17 |
| 13 | 4 | 91 | 36 | 40 | 17 |
| 14 | 4 | 98 | 40 | 41 | 17 |
| 15 | 4 | 100 | 44 | 42 | 16 |
| 16 | 4 | 110 | 48 | 43 | 16 |

O valor ótimo de $g_c$ (isto é, no $f$ máximo) é 13. Na natureza, $g_c$ varia de 12 a 14, o que corresponde a valores de $f$ muito próximos ao ótimo. Se você escolher outro valor para $t$, os números serão diferentes, mas o $g_c$ ótimo ainda será 13.

## Capítulo 16

1. **(a)**
❶ *Citrato-sintase*:
Acetil-CoA + oxaloacetato + $H_2O \rightarrow$ citrato + CoA.
❷ *Aconitase*:
Citrato $\rightarrow$ isocitrato.
❸ *Isocitrato-desidrogenase*:
Isocitrato + $NAD^+ \rightarrow \alpha$-cetoglutarato + $CO_2$ + NADH.
❹ *α-Cetoglutarato-desidrogenase*:
$\alpha$-Cetoglutarato +$NAD^+$ + CoA $\rightarrow$ succinil-CoA + $CO_2$ + NADH.
❺ *Succinil-CoA-sintetase*:
Succinil-CoA + $P_i$ + GDP $\rightarrow$ succinato + CoA + GTP.
❻ *Succinato-desidrogenase*:
Succinato + FAD $\rightarrow$ fumarato + $FADH_2$.
❼ *Fumarase*:
Fumarato + $H_2O \rightarrow$ malato.
❽ *Malato-desidrogenase*:
Malato + $NAD^+ \rightarrow$ oxaloacetato + NADH + $H^+$.
**(b)**, **(c)** ❶ CoA, condensação; ❷ nenhum, isomerização; ❸ $NAD^+$, descarboxilação oxidativa; ❹ $NAD^+$, CoA e pirofosfato de tiamina, descarboxilação oxidativa; ❺ CoA, fosforilação no nível do substrato; ❻ FAD, oxidação; ❼ nenhum, hidratação; ❽ $NAD^+$, oxidação.
**(d)** Acetil-CoA + $3NAD^+$ + FAD + GDP + $P_i$ + $2H_2O \rightarrow$
$2CO_2$ + CoA + 3NADH + $FADH_2$ + GTP + $2H^+$.
2. Glicose + 4ADP + $P_i$ + $10NAD^+$ + 2FAD $\rightarrow$
4ATP + 10NADH + $2FADH_2$ + $6CO_2$.
3. **(a)** Oxidação; metanol $\rightarrow$ formaldeído + [H—H].
**(b)** Oxidação; formaldeído $\rightarrow$ formato + [H—H].
**(c)** Redução; $CO_2$ + [H—H] $\rightarrow$ formato + $H^+$.
**(d)** Redução; glicerato + $H^+$ + [H—H] $\rightarrow$
gliceraldeído + $H_2O$.
**(e)** Oxidação; glicerol $\rightarrow$ di-hidroxiacetona + [H—H].
**(f)** Oxidação; $2H_2O$ + tolueno $\rightarrow$ benzoato + $H^+$ + 3[H—H].
**(g)** Oxidação; succinato $\rightarrow$ fumarato + [H—H].
**(h)** Oxidação; piruvato + $H_2O \rightarrow$ acetato + $CO_2$ + [H—H].
4. A partir das fórmulas estruturais, é possível observar que a razão H/C dos carbonos ligados do ácido hexanoico (11/6) é maior do que aquela da glicose (7/6). O ácido hexanoico é mais reduzido e gera mais energia com a completa combustão a $CO_2$ e $H_2O$.
5. **(a)** Oxidado; etanol + $NAD^+ \rightarrow$ acetaldeído + NADH + $H^+$.
**(b)** Reduzido; 1,3-bifosfoglicerato + NADH + $H^+ \rightarrow$
gliceraldeído-3-fosfato + $NAD^+$ + $HPO_4^{-2}$.
**(c)** Inalterado; piruvato + $H^+ \rightarrow$ acetaldeído + $CO_2$.
**(d)** Oxidado; piruvato + $NAD^+ \rightarrow$ acetato + $CO_2$ + NADH + $H^+$.
**(e)** Reduzido; oxaloacetato + NADH + $H^+ \rightarrow$ malato + $NAD^+$.
**(f)** Inalterado; acetoacetato + $H^+ \rightarrow$ acetona + $CO_2$.
6. *TPP*: o anel tiazólico se adiciona ao carbono $\alpha$ do piruvato e então estabiliza o carbânion resultante atuando como escoadouro de elétrons. *Ácido lipoico*: oxida o piruvato no nível do acetato (acetil-CoA) e ativa o acetato à forma tioéster. *CoA-SH*: ativa o acetato à forma tioéster. *FAD*: oxida o ácido lipoico. *$NAD^+$*: oxida o FAD.
7. A falta de TPP inibe a piruvato-desidrogenase; o piruvato se acumula.
8. Descarboxilação oxidativa; $NAD^+$ ou $NADP^+$; $\alpha$-cetoglutarato-desidrogenase.
9. O consumo de oxigênio é uma medida da atividade dos dois primeiros estágios da respiração celular: glicólise e ciclo do ácido cítrico. A adição de oxaloacetato ou malato estimula o ciclo do ácido cítrico e, portanto, estimula a respiração. O oxaloacetato e o malato adicionados desempenham função catalítica, pois são regenerados na última parte do ciclo do ácido cítrico.
10. **(a)** $5{,}6 \times 10^{-6}$ **(b)** $1{,}1 \times 10^{-8}$ M **(c)** 28 moléculas.
11. ADP (ou GDP), $P_i$, CoA-SH, TPP, $NAD^+$; *não* é necessário adicionar o ácido lipoico, o qual está covalentemente ligado às enzimas que o utilizam.
12. Os nucleotídeos de flavina, FMN e FAD não seriam sintetizados. Como o FAD é necessário para o ciclo do ácido cítrico, a deficiência de flavina marcadamente inibiria o ciclo.
13. O oxaloacetato pode ser desviado para a síntese de aspartato ou para a gliconeogênese. O oxaloacetato é reposto pelas reações anapleróticas catalisadas pela PEP-carboxicinase, PEP-carboxilase, enzima málica ou piruvato-carboxilase (ver Figura 16-16).
14. O grupo fosfato terminal do GTP pode ser transferido ao ADP por meio de uma reação catalisada pela nucleosídeo-difosfato-cinase, com constante de equilíbrio igual a 1,0: GTP + ADP $\rightarrow$ GDP + ATP.
15. **(a)** $^-OOC—CH_2—CH_2—COO^-$ (succinato). **(b)** O malonato é um inibidor competitivo da succinato-desidrogenase. **(c)** Um bloqueio do ciclo do ácido cítrico interrompe, sucessivamente, a formação de NADH, a transferência de elétrons e a respiração. **(d)** Um grande excesso de succinato (substrato) supera a inibição competitiva.
16. **(a)** Adicione [$^{14}$C]glicose uniformemente marcada e verifique a liberação de $^{14}CO_2$. **(b)** Igualmente distribuído entre C-2 e C-3 no oxaloacetato; um número infinito.
17. O oxaloacetato se equilibra com o succinato, no qual C-1 e C-4 são equivalentes. O oxaloacetato derivado do succinato é marcado em C-1 e C-4, e o PEP derivado desse oxaloacetato está marcado no C-1, que dá origem aos C-3 e C-4 da glicose.
18. **(a)** C-1. **(b)** C-3. **(c)** C-3. **(d)** C-2. (grupo metil). **(e)** C-4 **(f)** C-4 **(g)** igualmente distribuído entre C-2 e C-3.
19. A tiamina é necessária para a síntese de TPP, um grupo prostético dos complexos da piruvato-desidrogenase e $\alpha$-cetoglutarato-desidrogenase. Uma deficiência de tiamina reduz a atividade desses complexos enzimáticos e causa o observado acúmulo dos precursores.
20. Não. Para cada dois carbonos que entram na forma de acetato, dois deixam o ciclo na forma de $CO_2$; portanto, não há síntese líquida de oxaloacetato. A síntese líquida de oxaloacetato ocorre pela descarboxilação do piruvato, reação anaplerótica.
21. Sim, o ciclo do ácido cítrico seria inibido. O oxaloacetato está presente em concentrações relativamente baixas na mitocôndria, e sua remoção para a gliconeogênese tenderia a deslocar o equilíbrio da reação da citrato-sintase no sentido do oxaloacetato.
22. **(a)** Inibição da aconitase. **(b)** Fluorocitrato; compete com o citrato; por um grande excesso de citrato. **(c)** Citrato e fluorocitrato são inibidores da PFK-1. **(d)** Todos os processos catabólicos necessários para a produção de ATP estão bloqueados.
23. *Glicólise*:
Glicose + $2P_i$ + 2ADP + $2NAD^+ \rightarrow$
2 piruvato + 2ATP + 2NADH + $2H^+$ + $2H_2O$.
*Reação da piruvato-carboxilase*:
2 Piruvato + $2CO_2$ + 2ATP + $2H_2O \rightarrow$
2 oxaloacetato + 2ADP + $2P_i$ + $4H^+$.
*Reação da malato-desidrogenase:*
2 Oxaloacetato + 2 NADH + 2 $H^+ \rightarrow$ 2 L-malato + $2NAD^+$.
Isso recicla as coenzimas de nicotinamida sob condições anaeróbias. A reação geral é

$$\text{Glicose} + 2CO_2 \rightarrow 2\ \text{L-malato} + 4\ H^+.$$

Isso produz quatro $H^+$ por glicose, aumentando a acidez e, portanto, o sabor adstringente do vinho.
24. Reação resultante: 2 Piruvato + ATP + $2NAD^+$ + $H_2O \rightarrow$
$\alpha$-cetoglutarato + $CO_2$ + ADP + $P_i$ + 2NADH + $3H^+$.
25. O ciclo participa de processos catabólicos e anabólicos. Por exemplo, ele gera ATP pela oxidação de substratos, mas também fornece precursores para a síntese de aminoácidos (ver Figura 16-16).

**26.** **(a)** diminui. **(b)** aumenta. **(c)** diminui.

**27.** **(a)** O citrato é produzido pela ação da citrato-sintase sobre oxaloacetato e acetil-CoA. A citrato-sintase pode ser utilizada para a síntese líquida de citrato quando (1) existe um influxo contínuo de oxaloacetato e acetil-CoA novos e (2) a síntese de isocitrato está limitada, como em um meio com baixo nível de $Fe^{3+}$. A aconitase requer $Fe^{3+}$, portanto um meio pobre em $Fe^{3+}$ restringe a síntese da aconitase.

**(b)** Sacarose + $H_2O \rightarrow$ glicose + frutose

Glicose + $2P_i$ + 2ADP + $2NAD^+ \rightarrow$
2 piruvato + 2ATP + 2NADH + $2H^+$ + $2H_2O$.

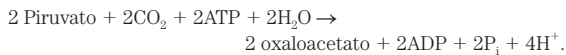
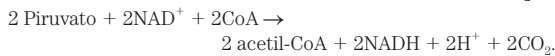
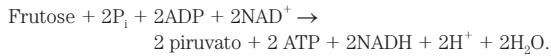
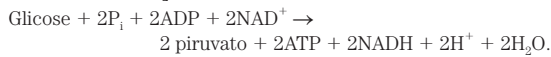
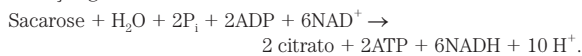
Frutose + $2P_i$ + 2ADP + $2NAD^+ \rightarrow$
2 piruvato + 2 ATP + 2NADH + $2H^+$ + $2H_2O$.

2 Piruvato + $2NAD^+$ + 2CoA $\rightarrow$
2 acetil-CoA + 2NADH + $2H^+$ + $2CO_2$.

2 Piruvato + $2CO_2$ + 2ATP + $2H_2O \rightarrow$
2 oxaloacetato + 2ADP + $2P_i$ + $4H^+$.

2 Acetil-CoA + 2 oxaloacetato + $2H_2O \rightarrow$ 2 citrato + 2CoA.

A reação geral é

Sacarose + $H_2O$ + $2P_i$ + 2ADP + $6NAD^+ \rightarrow$
2 citrato + 2ATP + 6NADH + 10 $H^+$.

**(c)** A reação geral consome $NAD^+$. Como o conteúdo celular dessa coenzima oxidada é limitado, ela deve ser reciclada pela cadeia transportadora de elétrons com o consumo de $O_2$. Consequentemente, a conversão global de sacarose a ácido cítrico é um processo aeróbio e requer oxigênio molecular.

**28.** A succinil-CoA é um intermediário do ciclo do ácido cítrico; seu acúmulo sinaliza um fluxo reduzido ao longo do ciclo, demandando uma entrada reduzida de acetil-CoA para dentro do ciclo. A citrato-sintase, por meio da regulação da via oxidativa principal da célula, regula o suprimento de NADH e, portanto, o fluxo de elétrons do NADH para o $O_2$.

**29.** O catabolismo de ácidos graxos eleva a [acetil-CoA], o que estimula a piruvato-carboxilase. O resultante aumento na [oxaloacetato] estimula o consumo de acetil-CoA pelo ciclo do ácido cítrico, e a [citrato] aumenta, inibindo a glicólise no nível da PFK-1. Além disso, a elevada [acetil-CoA] inibe o complexo piruvato-desidrogenase, diminuindo a utilização do piruvato proveniente da glicólise.

**30.** O oxigênio é necessário para a reciclagem do $NAD^+$ a partir do NADH produzido pelas reações oxidativas do ciclo do ácido cítrico. A reoxidação do NADH ocorre durante a fosforilação oxidativa mitocondrial.

**31.** O aumento na $[NADH]/[NAD^+]$ inibe o ciclo do ácido cítrico, pela ação das massas, nas três etapas de redução do $NAD^+$; a alta [NADH] desloca o equilíbrio em direção ao $NAD^+$.

**32.** Na direção do citrato; o $\Delta G$ para a reação da citrato-sintase sob essas condições é aproximadamente − 8 kJ/mol.

**33.** As etapas ❹ e ❺ são essenciais para a reoxidação do cofator lipoamida reduzido dessa enzima.

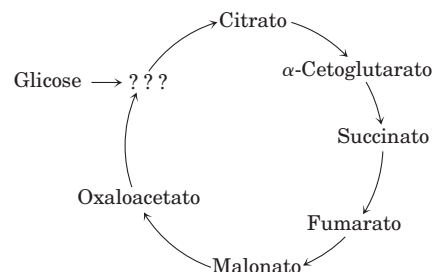
**34.** O ciclo do ácido cítrico é tão essencial ao metabolismo que um defeito grave em qualquer enzima do ciclo seria provavelmente letal ao embrião.

**35.** A primeira enzima de cada via está sob regulação alostérica recíproca. A inibição de uma via desvia o isocitrato para a outra via.

**36.** **(a)** A única reação no tecido muscular que consome quantidades significativas de oxigênio é a respiração celular, de maneira que o consumo de $O_2$ é uma boa representação da respiração. **(b)** O tecido muscular recentemente preparado contém alguma glicose residual; o consumo de $O_2$ é devido à oxidação dessa glicose. **(c)** Sim. Como a quantidade de $O_2$ consumida aumentou quando citrato ou 1-fosfoglicerol foi adicionado, ambos podem atuar como substratos para a respiração celular nesse sistema. **(d)** *Experimento I*: o citrato causa um consumo de $O_2$ muito maior do que seria esperado de sua completa oxidação. Cada molécula de citrato parece atuar como se fosse mais de uma molécula. A única explicação possível é que cada molécula de citrato participa mais de uma vez da reação – o modo como um catalisador atua. *Experimento II*: a chave é calcular o excesso de $O_2$ consumido em cada amostra em comparação com o controle (amostra 1).

| Amostra | Substrato(s) adicionado(s) | $\mu$L de $O_2$ absorvidos | Excesso de $\mu$L de $O_2$ consumidos |
|---|---|---|---|
| 1 | Sem substrato extra | 342 | 0 |
| 2 | 0,3 mL de 1-fosfoglicerol 0,2 M | 757 | 415 |
| 3 | 0,15 mL de citrato 0,02 M | 431 | 89 |
| 4 | 0,3 mL 0,2 M 1-fosfoglicerol + 0,15 mL de citrato 0,02 M | 1.385 | 1.043 |

Se tanto citrato quanto o 1-fosfoglicerol fossem simplesmente substratos da reação, você esperaria que o excesso no consumo de $O_2$ pela amostra 4 fosse a soma dos excessos nos consumos individuais das amostras 2 e 3 (415 $\mu$L + 89 $\mu$L = 504 $\mu$L). Entretanto, o excesso no consumo quando ambos os substratos estão presentes é aproximadamente o dobro dessa quantidade (1.043 $\mu$L). Portanto, o citrato aumenta a capacidade do tecido de metabolizar 1-fosfoglicerol. Esse comportamento é típico de um catalisador. Ambos os experimentos (I e II) são necessários para tornar esse argumento convincente. Com base apenas no experimento I, o citrato está, de alguma maneira, acelerando a reação, porém não está claro se ele atua auxiliando o metabolismo do substrato ou por meio de algum outro mecanismo. Com base apenas no experimento II, não está claro qual molécula é o catalisador, citrato ou 1-fosfoglicerol. Juntos, os experimentos mostram que o citrato atua como "catalisador" para a oxidação do 1-fosfoglicerol. **(e)** Dado que a via pode consumir citrato (ver amostra 3), para que o citrato atue como catalisador, ele deve ser regenerado. Para que o conjunto das reações primeiro consuma e, posteriormente, regenere o citrato, a via deve ser circular em vez de linear. **(f)** Quando a via está bloqueada na $\alpha$-cetoglutarato-desidrogenase, o citrato é convertido a $\alpha$-cetoglutarato, porém a via não pode prosseguir. O oxigênio é consumido pela reoxidação do NADH produzido pela isocitrato-desidrogenase.

**(g)**

Essa via difere da mostrada na Figura 16-7 por não incluir *cis*-aconitato e isocitrato (entre citrato e $\alpha$-cetoglutarato), ou succinil-CoA, ou acetil-CoA. **(h)** O estabelecimento de uma conversão quantitativa foi fundamental para excluir a possibilidade de uma via ramificada ou mais complexa.

## Capítulo 17

**1.** A porção de ácido graxo; os carbonos dos ácidos graxos estão mais reduzidos do que no glicerol.

**2.** **(a)** $4{,}0 \times 10^5$ kJ ($9{,}6 \times 10^4$ kcal) **(b)** 48 dias **(c)** 0,48 lb/dia

**3.** A primeira etapa da oxidação dos ácidos graxos é análoga à conversão do succinato a fumarato; a segunda etapa, à conversão do fumarato a malato; a terceira etapa, à conversão do malato a oxaloacetato.

**4.** Oito ciclos; o último libera 2 acetil-CoA.

**5.** **(a)** R—$COO^-$ + ATP $\rightarrow$ acil-AMP + $PP_i$.
Acil-AMP + CoA $\rightarrow$ acil-CoA + AMP.

**(b)** Hidrólise irreversível de $PP_i$ a $2P_i$ pela pirofosfatase inorgânica celular.

**6.** *cis*-$\Delta^3$-dodecanoil-CoA é convertido em *cis*-$\Delta^2$-dodecanoil-CoA e, a seguir, em $\beta$-hidroxidodecanoil-CoA.

**7.** Quatro acetil-CoA e 1 propionil-CoA.

**8.** Sim. Uma parte do trítio é removida do palmitato durante as reações de desidrogenação da $\beta$-oxidação. O trítio removido aparece como água tritiada.

**9.** Os grupos acil-graxos condensados com CoA no citosol são primeiro transferidos para a carnitina, com liberação de CoA, e então transportados para a mitocôndria, onde são novamente condensados com a CoA. Os reservatórios citosólicos e mitocondriais de CoA são, dessa forma, mantidos separados, e a CoA radioativa do reservatório citosólico não entra na mitocôndria.

**10.** **(a)** No pombo, predomina a $\beta$-oxidação; no faisão, predomina a glicólise anaeróbia do glicogênio. **(b)** A musculatura do pombo consome mais $O_2$. **(c)** A gordura contém mais energia por grama do que o glicogênio. Além disso, a degradação anaeróbia do glicogênio é limitada pela tolerância do tecido ao lactato formado. Assim, o pombo, que funciona com o metabolismo oxidativo das gorduras, é o voador de longa distância. **(d)** Essas enzimas são as reguladoras de suas respectivas vias e, assim, limitam as taxas de produção de ATP.

**11.** O malonil-CoA não inibiria mais a entrada dos ácidos graxos na mitocôndria e na $\beta$-oxidação, de forma que poderia ser um ciclo fútil de síntese simultânea de ácidos graxos no citosol e degradação na mitocôndria.

**12.** **(a)** A entrada de ácidos graxos na mitocôndria, mediada pela carnitina, é a etapa limitante da velocidade na oxidação. A deficiência de carnitina reduz a oxidação dos ácidos graxos; a adição de carnitina aumenta a taxa. **(b)** Todos aumentam a necessidade metabólica da oxidação dos ácidos graxos. **(c)** A deficiência de carnitina poderia ser resultado de uma deficiência do seu precursor, lisina, ou de um defeito em uma das enzimas da biossíntese da carnitina.

**13.** A oxidação das gorduras libera água metabólica; 1,4 L de água por kg de tripalmitoilglicerol (ignorar a pequena contribuição do glicerol para a massa total).

**14.** As bactérias podem ser usadas para oxidar completamente os hidrocarbonetos em $CO_2$ e $H_2O$. Contudo, pode ser difícil conseguir contato entre os hidrocarbonetos e as enzimas bacterianas. Nutrientes bacterianos como o nitrogênio e fósforo podem ser limitantes e inibir o crescimento.

**15.** **(a)** $M_r$ 136; ácido fenilacético **(b)** Par.

**16.** Uma vez que o reservatório de CoA mitocondrial é pequeno, essa deve ser reciclada a partir de acetil-CoA via a formação de corpos cetônicos. Isso permite o funcionamento da via da $\beta$-oxidação, necessária para a produção de energia.

**17.** **(a)** A glicose gera piruvato via glicólise, e o piruvato é a principal fonte de oxaloacetato. Sem glicose na dieta, a [oxaloacetato] cai, e o ciclo do ácido cítrico reduz a velocidade. **(b)** De número ímpar; a conversão do propionato em succinil-CoA fornece intermediários para o ciclo do ácido cítrico e precursores de quatro carbonos para a gliconeogênese.

**18.** Para o ácido heptanoico de cadeia ímpar, a $\beta$-oxidação produz propionil-CoA, que pode ser convertida, em várias etapas, a oxaloacetato, um material de partida para a gliconeogênese. Os ácidos graxos de cadeia par não mantêm a gliconeogênese, porque são completamente oxidados a acetil-CoA.

**19.** A $\beta$-oxidação do $\omega$-fluoroleato forma fluoracetil-CoA, que entra no ciclo do ácido cítrico e produz fluorcitrato, potente inibidor da aconitase. A inibição dessa enzima paralisa o ciclo do ácido cítrico. Sem os equivalentes redutores do ciclo do ácido cítrico, a fosforilação oxidativa (síntese de ATP) é reduzida.

**20.** Ser por Ala: bloqueia a $\beta$-oxidação na mitocôndria. Ser por Asp: bloqueia a síntese dos ácidos graxos, estimula a $\beta$-oxidação.

**21.** A resposta ao glucagon ou à adrenalina seria prolongada, provocando maior mobilização de ácidos graxos nos adipócitos.

**22.** A enz-FAD, por ter um potencial padrão de redução mais positivo, é um aceptor de elétrons melhor do que o $NAD^+$, e a reação é conduzida no sentido da oxidação do acil-CoA-graxo. Esse equilíbrio mais favorável é obtido com o gasto de 1 ATP; somente 1,5 ATP é produzido por cada $FADH_2$ oxidado na cadeia respiratória (*vs.* 2,5 por NADH).

**23.** Nove voltas; o ácido araquídico, ácido graxo saturado com 20 carbonos, gera 10 moléculas de acetil-CoA, as duas últimas formadas na nona volta.

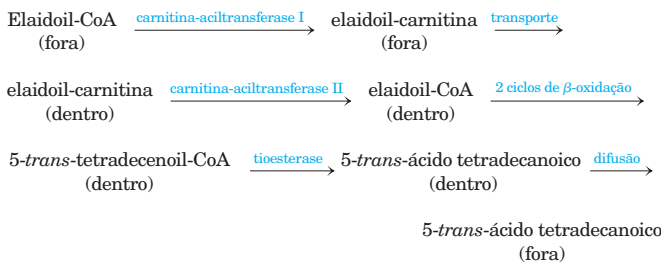
**24.** Ver Figura 17-12. Forma-se [3-$^{14}$C]succinil-CoA, que produz oxaloacetato marcado no C-2 e no C-3.

**25.** Ácido fitânico → ácido pristânico → propionil-CoA → → → succinil-CoA → succinato → fumarato → malato. Todos os carbonos do malato seriam marcados, mas C-1 e C-4 teriam somente metade da marcação do C-2 e C-3.

**26.** A hidrólise de ATP nas reações celulares que requerem energia capta água na reação $ATP + H_2O \rightarrow ADP + P_i$; assim, no estado estacionário, não há produção *resultante* de $H_2O$.

**27.** A metilmalonil-CoA-mutase requer o cofator que contém cobalto formado a partir da vitamina $B_{12}$.

**28.** A perda de massa é de quase 0,66 kg por dia, ou quase 140 kg em 7 meses. A cetose pode ser evitada pela degradação de proteínas corporais não essenciais para suprir os esqueletos de aminoácidos para a gliconeogênese.

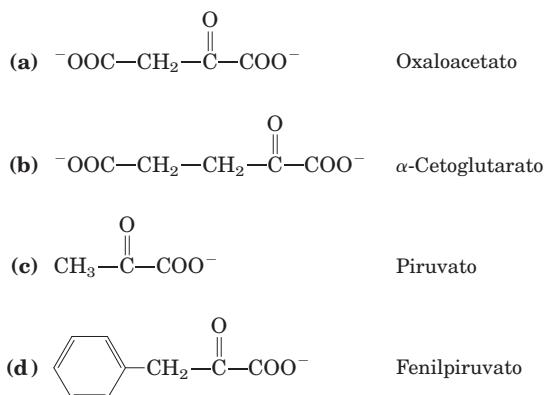
**29.** **(a)** Os ácidos graxos são convertidos em seus derivados acil-coA por enzimas do citoplasma; os acil-CoA são então importados para a mitocôndria e oxidados. Dado que os pesquisadores utilizaram mitocôndrias isoladas, eles tiveram de usar derivados CoA. **(b)** O estearoil--CoA foi rapidamente convertido em nove moléculas de acetil-CoA pela via da $\beta$-oxidação. Todos os intermediários reagiram rapidamente, e nenhum deles foi detectado em níveis significativos. **(c)** Dois ciclos. Cada ciclo remove dois átomos de carbono, assim dois ciclos convertem um ácido graxo de 18 carbonos em um de 14 carbonos mais 2 acetil-CoA. **(d)** O $K_m$ é mais alto para o isômero *trans* do que para o *cis*, de forma que é necessária maior concentração do isômero *trans* para a mesma taxa de degradação. Grosso modo, o isômero *trans* não se liga tão bem quanto o *cis*, provavelmente porque diferenças de forma, mesmo que não sejam no sítio-alvo para a enzima, afetem a ligação do substrato à enzima. **(e)** O substrato da LCAD/VLCAD é formado de maneira diferente, dependendo do substrato em particular; isso é esperado para a etapa limitante da velocidade de uma via. **(f)** Os parâmetros cinéticos mostram que o isômero *trans* é um substrato mais pobre para a LCAD do que o *cis*, mas existe uma diferença pequena para a VLCAD. Por ser um substrato mais pobre, o isômero *trans* se acumula em níveis mais altos do que o *cis*. **(g)** Uma via possível está mostrada a seguir (indicando "dentro" e "fora" da mitocôndria).

**(h)** É correto à medida que as gorduras *trans* são degradadas com menos eficiência do que as *cis* e, assim, as gorduras *trans* podem "vazar" para fora da mitocôndria. Não é correto dizer que as gorduras *trans* não são degradadas pelas células; elas o são, mas a uma velocidade mais baixa do que as gorduras *cis*.

## Capítulo 18

**(a)** $^{-}OOC{-}CH_2{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}{-}COO^{-}$ Oxaloacetato

**(b)** $^{-}OOC{-}CH_2{-}CH_2{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}{-}COO^{-}$ $\alpha$-Cetoglutarato

**(c)** $CH_3{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}{-}COO^{-}$ Piruvato

**(d)** $C_6H_5{-}CH_2{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}{-}COO^{-}$ Fenilpiruvato

**2.** Este é um ensaio que utiliza reações acopladas. O produto da lenta transaminação (piruvato) é rapidamente consumido na "reação indicadora" subsequente, catalisada pela lactato-desidrogenase, que consome NADH. Assim, a velocidade de desaparecimento do NADH é uma medida da velocidade da reação da aminotransferase. A reação indicadora é monitorada pela observação do decréscimo na absorbância do NADH a 340 nm, com um espectrofotômetro.

**3.** Alanina e glutamina desempenham papéis especiais no transporte de grupos amino do músculo e de outros tecidos não hepáticos, respectivamente, para o fígado.

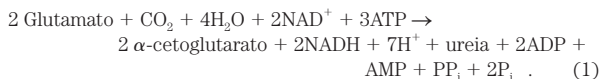
**4.** Não. O nitrogênio da alanina pode ser transferido para o oxaloacetato, por transaminação, para formar aspartato.

**5.** 15 mols de ATP por mol de lactato; 13 mols de ATP por mol de alanina, quando é incluída a remoção do nitrogênio.

**6.** **(a)** O jejum resultou em baixos níveis sanguíneos de glicose. A administração subsequente da dieta experimental levou a um rápido catabolismo de aminoácidos glicogênicos. **(b)** A desaminação oxidativa causou um aumento nos níveis de $NH_3$; a ausência de arginina (um intermediário do ciclo da ureia) impediu a conversão de $NH_3$ em ureia. A arginina não é sintetizada no gato em quantidades suficientes para satisfazer as necessidades impostas pelo estresse do experimento. Isso sugere que a arginina seja um aminoácido essencial na dieta do gato. **(c)** A ornitina é convertida em arginina pelo ciclo da ureia.

**7.** $H_2O$ + glutamato + $NAD^+ \rightarrow \alpha$-cetoglutarato + $NH_4^+$ + NADH + $H^+$
$NH_4^+$ + 2ATP + $H_2O$ + $CO_2 \rightarrow$ carbamoil-fosfato + 2ADP + $P_i$ + $3H^+$
Carbamoil-fosfato + ornitina $\rightarrow$ citrulina + $P_i$ + $H^+$
Citrulina + aspartato + ATP $\rightarrow$ arginino-succinato + AMP + $PP_i$ + $H^+$
Arginino-succinato $\rightarrow$ arginina + fumarato
Fumarato + $H_2O \rightarrow$ malato
Malato + $NAD^+ \rightarrow$ oxaloacetato + NADH + $H^+$
Oxaloacetato + glutamato $\rightarrow$ aspartato + $\alpha$-cetoglutarato
Arginina + $H_2O \rightarrow$ ureia + ornitina

---

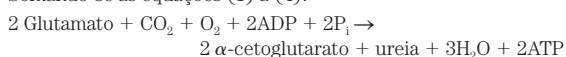
2 Glutamato + $CO_2$ + $4H_2O$ + $2NAD^+$ + 3ATP $\rightarrow$
2 $\alpha$-cetoglutarato + 2NADH + $7H^+$ + ureia + 2ADP + AMP + $PP_i$ + $2P_i$ . (1)

Reações adicionais que devem ser consideradas:

AMP + ATP $\rightarrow$ 2ADP (2)

$O_2$ + 8 $H^+$ + 2NADH + 6ADP + $6P_i \rightarrow 2NAD^+$ + 6ATP + $8H_2O$ (3)

$H_2O$ + $PP_i \rightarrow 2P_i$ + $H^+$ (4)

Somando-se as equações (1) a (4):

2 Glutamato + $CO_2$ + $O_2$ + 2ADP + $2P_i \rightarrow$
2 $\alpha$-cetoglutarato + ureia + $3H_2O$ + 2ATP

**8.** O segundo grupo amino introduzido na molécula da ureia é transferido a partir do aspartato, que é gerado durante a transaminação do glutamato para o oxaloacetato, reação catalisada pela aspartato-aminotransferase. Aproximadamente metade de todos os grupos amino excretados na forma de ureia deve passar pela reação da aspartato-aminotransferase, tornando essa aminotransferase a mais ativa dessas enzimas.

**9.** **(a)** Uma pessoa em uma dieta contendo apenas proteínas deve utilizar aminoácidos como principal fonte de combustível metabólico. Uma vez que o metabolismo dos aminoácidos requer que o grupo amino seja removido, por fim gerando ureia, o processo consome quantidades anormalmente grandes de água para diluir e excretar a ureia na urina. Além disso, eletrólitos contidos na "proteína líquida" devem ser diluídos com água e excretados. Se a perda diária de água pelos rins não estiver equilibrada por uma ingestão suficiente de água, o resultado será perda líquida da água corporal.
**(b)** Ao se considerar os benefícios nutricionais das proteínas, deve-se ter em mente a quantidade total de aminoácidos, necessária para a síntese proteica, e a distribuição de aminoácidos nas proteínas da dieta. A gelatina contém uma distribuição de aminoácidos inadequada do ponto de vista nutricional. Como grandes quantidades de gelatina são ingeridas e o excesso de aminoácidos é catabolizado, é possível que a capacidade do ciclo da ureia seja excedida, levando à toxicidade por amônia. Isso é ainda mais complicado pela desidratação que pode resultar da excreção de grandes quantidades de ureia. Uma combinação desses dois fatores pode levar ao coma e à morte.

**10.** Lisina e leucina.

**11.** **(a)** Fenilalanina-hidroxilase; dieta com baixo conteúdo de fenilalanina. **(b)** A rota normal para o metabolismo da fenilalanina, via hidroxilação, produzindo tirosina, está bloqueada, e a fenilalanina se acumula. **(c)** A fenilalanina é transformada em fenilpiruvato por transaminação e, a seguir, em fenilactato por redução. A reação de transaminação apresenta uma constante de equilíbrio de 1,0, e o fenilpiruvato é formado em quantidades significativas quando a fenilalanina se acumula. **(d)** Em virtude da deficiência na produção de tirosina, precursora da melanina, o pigmento normalmente presente no cabelo.

**12.** O catabolismo dos esqueletos carbonados da valina, da metionina e da isoleucina está prejudicado em virtude da ausência de função da metilmalonil-CoA-mutase (enzima que utiliza vitamina $B_{12}$ como coenzima). Os efeitos fisiológicos da perda dessa enzima estão descritos na Tabela 18-2 e no Quadro 18-2.

**13.** A dieta vegana apresenta carência de vitamina $B_{12}$, levando a um aumento de homocisteína e metilmalonato (refletindo deficiências na metionina-sintase e na metilmalonato-mutase, respectivamente) em indivíduos que adotam essa dieta por vários anos. Na dieta lacto-vegetariana, os laticínios fornecem certa quantidade de vitamina $B_{12}$.

**14.** As formas genéticas de anemia perniciosa geralmente surgem como resultado de defeitos nas vias responsáveis por mediar a absorção de vitamina $B_{12}$ da dieta (ver Quadro 17-2). Uma vez que suplementos dietéticos não são absorvidos pelo intestino, essas condições são tratadas pela administração intravenosa de suplementos de $B_{12}$.

**15.** O mecanismo é idêntico àquele da serina-desidratase (ver Figura 18-20a), exceto pelo fato de que o grupo metil adicional de treonina é mantido, produzindo $\alpha$-cetobutirato em vez de piruvato.

**16.**

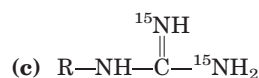
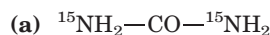
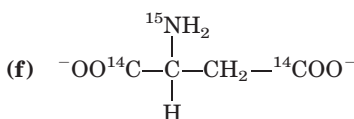
**(a)** $^{15}NH_2{-}CO{-}^{15}NH_2$

**(b)** $^{-}OO^{14}C{-}CH_2{-}CH_2{-}^{14}COO^{-}$

**(c)** $R{-}NH{-}\overset{\overset{^{15}NH}{\|}}{C}{-}^{15}NH_2$

**(d)** $R{-}NH{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}{-}^{15}NH_2$

**(e)** Não identificado

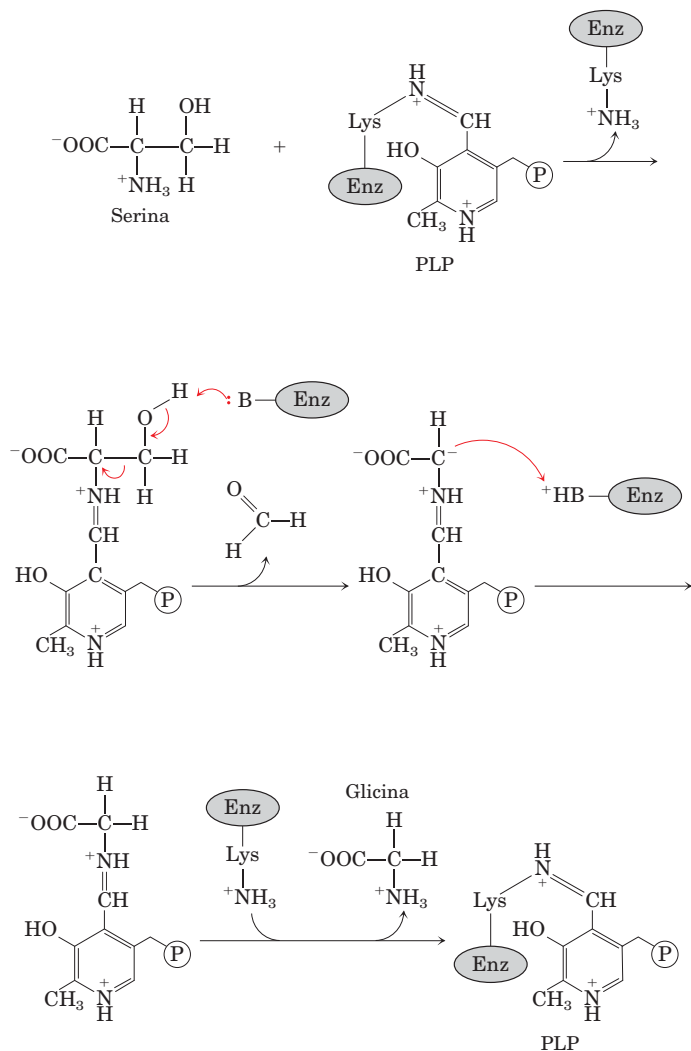
**(f)** $^{-}OO^{14}C{-}\underset{\underset{H}{|}}{\overset{\overset{^{15}NH_2}{|}}{C}}{-}CH_2{-}^{14}COO^{-}$

**17.** **(a)** Isoleucina $\xrightarrow{❶}$ II $\xrightarrow{❷}$ IV $\xrightarrow{❸}$ I $\xrightarrow{❹}$ V $\xrightarrow{❺}$ III $\xrightarrow{❻}$ acetil-CoA + propionil-CoA. **(b)** Passo ❶ transaminação, sem reação análoga, PLP; ❷ descarboxilação oxidativa, análoga à reação da piruvato-desidrogenase, $NAD^+$, TPP, lipoato, FAD; ❸ oxidação, análoga à reação da succinato-desidrogenase, FAD; ❹ hidratação, análoga à reação da fumarase, sem cofatores; ❺ oxidação, análoga à reação da malato-desidrogenase, $NAD^+$; ❻ tiólise (reação reversa da condensação aldólica), análoga à reação da tiolase, CoA.

**18.** Um mecanismo provável seria:

Serina

PLP

Glicina

PLP

O formaldeído produzido (HCHO) no segundo passo reage rapidamente com tetra-hidrofolato no sítio ativo da enzima, produzindo $N^5$,$N^{10}$-metilenotetra-hidrofolato (ver Figura 18-17).

**19.** **(a)** Transaminação; sem analogias; PLP. **(b)** Descarboxilação oxidativa; análoga à descarboxilação oxidativa do piruvato em acetil-CoA, anteriormente à sua entrada no ciclo do ácido cítrico, e à descarboxilação do $\alpha$-cetoglutarato em succinil-CoA no ciclo do ácido cítrico; $NAD^+$, FAD, lipoato e TPP. **(c)** Desidrogenação (oxidação); análoga à desidrogenação do succinato em fumarato no ciclo do ácido cítrico e de acil-CoA em enoil-CoA na $\beta$-oxidação; FAD. **(d)** Carboxilação; sem analogias no ciclo do ácido cítrico ou na $\beta$-oxidação; ATP e biotina. **(e)** Hidratação; análoga à hidratação do fumarato em malato no ciclo do ácido cítrico e de enoil-CoA em 3-hidroxiacil-CoA na $\beta$-oxidação; sem cofatores. **(f)** Reação aldólica reversa; análoga à reação reversa da citrato-sintase no ciclo do ácido cítrico; sem cofatores.

**20.** **(a)** Leucina; valina; isoleucina. **(b)** Cisteína (produzida a partir da cistina). Se a cisteína for descarboxilada, como mostrado na Figura 18-6, produzirá $H_3N^+$—$CH_2$—$CH_2$—SH, que pode ser oxidada, produzindo taurina. **(c)** O sangue colhido em janeiro de 1957 mostra níveis significativamente elevados de isoleucina, leucina, metionina e valina; a urina analisada em janeiro de 1957 mostra níveis significativamente aumentados de isoleucina, leucina, taurina e valina. **(d)** Todos os pacientes apresentavam níveis altos de isoleucina, leucina e valina, tanto no sangue quanto na urina, sugerindo uma deficiência na degradação desses aminoácidos. Uma vez que a urina também continha níveis elevados dos $\alpha$-cetoácidos correspondentes a esses três aminoácidos, o bloqueio na via deve ocorrer após a desaminação, mas anteriormente à desidrogenação (como mostrado na Figura 18-28). **(e)** O modelo não explica os níveis elevados de metionina no sangue e de taurina na urina. Os níveis elevados de taurina talvez ocorram devido à morte de células nervosas durante o estágio final da doença. A razão para os níveis elevados de metionina no sangue, no entanto, não é clara; a via de degradação da metionina não está ligada com a degradação dos aminoácidos de cadeia ramificada. O aumento da metionina poderia ser um efeito secundário do aumento de outros aminoácidos. É importante considerarmos que as amostras de janeiro de 1957 eram de um indivíduo que estava morrendo, de modo que não é apropriada a comparação de resultados de testes de sangue e urina com um indivíduo saudável. **(f)** A informação a seguir é necessária (e foi por fim obtida por outros pesquisadores): (1) A atividade da desidrogenase está significativamente reduzida ou ausente em indivíduos com a doença do xarope de bordo. (2) A doença é herdada como defeito em um único gene. (3) O defeito ocorre em um gene que codifica toda ou parte da desidrogenase. (4) O defeito genético leva à produção de uma enzima inativa.

## Capítulo 19

**1.** *Reação (1):* (a), (d) NADH; (b), (e) E-FMN; (c) $NAD^+$/NADH e E-FMN/$FMNH_2$.
*Reação 2:* (a), (d) E-$FMNH_2$; (b), (e) $Fe^{+3}$; (c) E-FMN/$FMNH_2$ e $Fe^{+3}$/$Fe^{+2}$.
*Reação (3):* (a), (d) $Fe^{+2}$; (b), (e) Q; (c) $Fe^{+3}$/$Fe^{+2}$ e Q/$QH_2$.

**2.** A cadeia lateral torna a ubiquinona solúvel em lipídeos e permite sua difusão na membrana semifluida.

**3.** Pela diferença no potencial padrão de redução ($\Delta E'°$) para cada par de meia-reação, pode-se calcular $\Delta G'°$. A oxidação do succinato pelo FAD é favorecida pela variação de energia livre negativa ($\Delta G'° = -3{,}7$ kJ/mol). A oxidação pelo $NAD^+$ requer uma grande variação de energia livre positiva ($\Delta G'° = 68$ kJ/mol).

**4.** **(a)** Todos os carreadores estão reduzidos; $CN^-$ bloqueia a redução do $O_2$ catalisada pela citocromo-oxidase. **(b)** Todos os carreadores estão reduzidos; na ausência de $O_2$, os carreadores reduzidos não são reoxidados. **(c)** Todos os carreadores estão oxidados. **(d)** Os carreadores iniciais estão mais reduzidos; os carreadores finais estão mais oxidados.

**5.** **(a)** A inibição da NADH-desidrogenase pela rotenona reduz a velocidade do fluxo de elétrons pela cadeia respiratória, o que, por sua vez, reduz a taxa de produção de ATP. Se essa taxa reduzida não for capaz de suprir as necessidades do organismo por ATP, ele morrerá. **(b)** A actinomicina A inibe fortemente a oxidação da coenzima Q na cadeia respiratória, reduzindo a velocidade de transferência de elétrons e levando às consequências descritas em (a). **(c)** Uma vez que a actinomicina A bloqueia *todo* o fluxo de elétrons para o oxigênio, ela é um veneno mais potente do que a rotenona, a qual bloqueia o fluxo de elétrons a partir do NADH, mas não do $FADH_2$.

**6.** **(a)** A velocidade de transferência de elétrons necessária para suprir a demanda de ATP aumenta, e por isso a relação P/O diminui. **(b)** Uma alta concentração do desacoplador reduz a relação P/O para quase zero. A relação P/O diminui, e é necessário oxidar mais combustível para gerar a mesma quantidade de ATP. O calor extra liberado por essa oxidação eleva a temperatura corporal. **(c)** A atividade aumen-